

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Moubina HASSANEIN

Pharmacien - Licenciée ès sciences - Lauréat de la Faculté de Pharmacie de
Montpellier - Diplômée du certificat supérieur de Chimie Biologique -
Diplômée du certificat d'études spéciales de Sérologie appliquée au diagnostic
des maladies vénériennes

PREMIÈRE THÈSE

Etude de l'évolution des différents constituants phosphorés
et des phosphomonoestérases de la Moule (*Mytilus*
galloprovincialis Lmk)

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

soutenues le 19 mai 1964 devant la commission d'examen

M. E. KAHANE Président

Mme G. VERNET
M. P. MONNIER } Examineurs

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Moubina HASSANEIN

Pharmacien - Licenciée ès sciences - Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Montpellier - Diplômée du certificat supérieur de Chimie Biologique - Diplômée du certificat d'études spéciales de Sérologie appliquée au diagnostic des maladies vénériennes

PREMIÈRE THÈSE

Etude de l'évolution des différents constituants phosphorés et des phosphomonoestérases de la moule (*Mytilus galloprovincialis* Lmk)

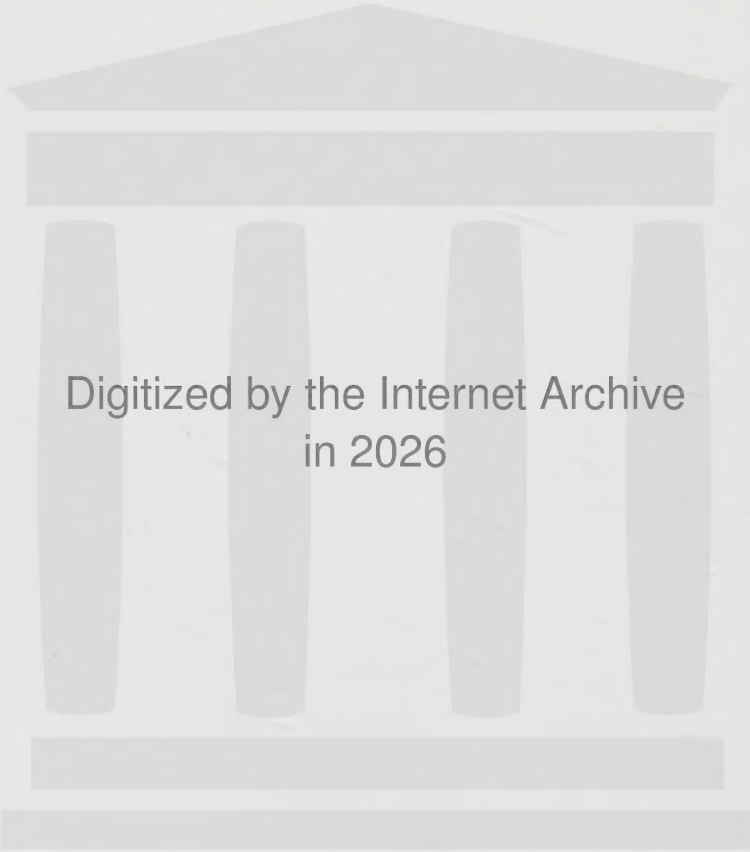
DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

soutenues le 19 mai 1964 devant la commission d'examen

M. E. KAHANE Président

Mme G. VERNET
M. P. MONNIER } Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

Liste des Professeurs

DOYEN

B. CHARLES

ASSESSEURS

R. JOUTY

I. ASSENMACHER

DOYEN HONORAIRE

P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES

R. JACQUES	J. SOULA
M. CASTERAS	G. DENIZOT
E. CARRIÈRE	J. GRANIER
E. TURRIÈRE	

PROFESSEURS TITULAIRES

M. MOUSSERON	Chimie
L. EMBERGER	Botanique
Ch. BOUHET	Physique
P. MATHIAS	Zoologie et Biologie générale
J.-P. ROIG	Physique
P. CHATELAIN	Minéralogie et cristallographie
M ^{lle} O. TUZET	Zoologie et Biologie générale
M ^{lle} G. CAUQUIL	Chimie
J. SALVINIEN	Chimie-Physique
G. COUCHET	Mécanique supérieure
M ^{lle} A. M. VERGNOUX	Physique
J. AVIAS	Géologie
P. VIELES	Chimie
J. RABINOVITCH	Physique
E. KAHANE	Chimie biologique
J.J. MOREAU	Mécanique rationnelle
B. CHARLES	Mathématiques pures
J. MOTTE	Botanique
R. JOUTY	Physique
C. CHALIN	Physique
I. ASSENMACHER	Physiologie animale
B. PISTOULET	Physique
Ch. ROUMIEU	Mathématiques
A. POTIER	Chimie minérale
R. JACQUIER	Chimie
R. LAFONT	Physique
J. FALGUEIRETTES	Minéralogie

PROFESSEUR TITULAIRE EN SURNOMBRE

M. BOUX

Mathématiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme J. CHARLES	Mathématiques
Mme M. DE POUQUES	Botaniques
P. MURAOUR	Géophysique Appliquée
Mme M. LAFON	Mathématiques
M. MATTAUER	Géologie
P. CAILLON	Physique
G. TOURNE	Chimie
L. EUZET	Zoologie
J. REMY	Géologie
Mme G. VERNET	Biologie Animale
H. ANDRILLAT	Astronomie
P. DEMANGEON	Géologie
Ch. SAUVAGE	Botanique
A. BONNET	Botanique
J. ROUZAUD.	Chimie

MAITRES DE CONFÉRENCES

H. CHRISTOL	Chimie
E. GROUBERT	Physique
Mme H. GUASTALLA	Biologie Physico-Chimique
J. P. LAFON .	Mathématiques
A. STEINER	Psychophysiologie
G. LAMATY	Chimie
C. DELOUPY	Physique
L. GRAMBAST	Botanique
R. GAUFRES	Chimie
F. PROUST	Géologie
A. BASSOMPIERRE	Physique
A. MARTINEAU	Mathématiques
M. SAVELLI	Physique
J. PARIS (C.S.U.)	Zoologie
Mme DUBOUR-RAZAVET (C.S.U.)	Géologie
R. MARTY	Physiologie Animale
BOURDU	Botanique
M. MAURIN	Chimie
J. SOULIER (C.S.U.)	Chimie

CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

M. LEFRAN	Mathématiques
A. STURER	Mathématiques
Mlle A. BAILLETTE	Mathématiques
P. MOLINO (C.S.U.)	Mathématiques

SECRÉTAIRE PRINCIPAL

G. SIAU

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

*Symbole de dévouement. Je leur dois ce que
je suis. Qu'ils trouvent exprimés ici mon amour
filial et ma profonde gratitude.*

A MONSIEUR ET A MADAME KAHANE

Qui ont été pour moi comme mes parents.

A MES FRÈRES ET A MES SŒURS

Qui m'ont aidé avec tant de dévouement.

A HASSAN

Sincère et aimablement dévoué.

A MON AMIE ET SŒUR FATTOUM

Sa bonté et son dévouement n'ont pas de limites.

A MES BEAUX-FRÈRES

A MES NIÈCES ET A MES NEVEUX

A TOUS LES MIENS



AVANT-PROPOS

Je suis particulièrement heureuse, avant d'exposer ce travail, de pouvoir exprimer à mon Maître, Monsieur le professeur Kahane, mes sentiments de très vive et très sincère reconnaissance. Ses conseils bienveillants m'ont guidée au cours de ce travail. Son dynamisme et son inlassable activité de chercheur resteront pour moi un exemple. Ses conseils avisés et ses encouragements m'ont permis de mener à bien cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma très respectueuse et très profonde gratitude.

Je rends un respectueux hommage à mon Maître, Monsieur le professeur Monnier, professeur à la Faculté de Médecine, pour son enseignement éclairé de Biochimie et de Physiologie à la Faculté de Pharmacie. Il a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et a guidé mes premiers pas dans la recherche biochimique.

Madame Vernet, professeur de biologie animale, m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury; je la remercie des conseils avisés qu'elle m'a donnés pour l'élaboration de la deuxième thèse, elle m'a reçue avec une inlassable amabilité.

Mon Maître Monsieur le professeur Huguet a guidé ce travail étape par étape, il m'a inculqué avec patience les nombreux éléments qui concourent à la formation d'un biochimiste; son érudition et ses compétences m'ont initiée aux joies de la recherche. Je suis heureuse de lui dire mon attachement et ma reconnaissance.

* Je remercie Mademoiselle Arnavielhe-Bony pour l'attention qu'elle m'a réservée lors de mon travail au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie,

* Mademoiselle Soler qui a contribué activement à la réalisation de ce travail,

* Enfin mes collègues du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie pour leur coopération.

Je remercie Madame Guastalla, maître de conférences à la Faculté des Sciences qui m'a éclairée par ses connaissances physico-chimiques,

Monsieur Joseph Attias qui avec une amabilité toujours égale a contribué activement à l'élaboration de ce travail,

Monsieur et Madame Claude Colette pour l'aide technique qu'ils m'ont aimablement offerte,

Mademoiselle Montagné et tous mes collègues du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences qui ont créé une ambiance amicale et ont ainsi rendu la réalisation de ce travail plus agréable.

— Que mon amie Jocelyne Cirba trouve ici exprimés ma profonde amitié et mes remerciements.

Nous remercions M. Raimbault, Chef de la Station Ostreïculture de l'Institut Scientifique et technique des Pêches Maritimes à Sète pour nous avoir aimablement fourni les renseignements concernant la température de l'eau du bassin du Thau

INTRODUCTION

La production et la consommation des mollusques sur la côte méditerranéenne sont très importantes et posent des problèmes économiques et scientifiques qui méritent d'être tous résolus. Ils sont l'objet des préoccupations de divers centres de recherche scientifique et, notamment, à la Faculté de Pharmacie de Montpellier où sont étudiés les différents constituants biochimiques de la Moule.

Madame Escot-Molinié, du laboratoire de Chimie Analytique, a étudié (1953-1954) la composition de la Moule (sodium, calcium, aluminium, magnésium, plomb, fer, cuivre, arsenic, phosphore, silice, eau, glucides, azote total, protides, lipides et vitamines) et les variations de la valeur nutritive en fonction de la saison (maturité génitale) et du temps écoulé entre la pêche et le moment de la consommation. Elle a également étudié la toxine de la Moule [21].

Gras (1958), du laboratoire de Chimie Biologique, a étudié les fluctuations au cours du cycle annuel de la Moule des différents composés glucidiques (glycogène), lipidiques (lipides totaux et phospholipides) et protidiques (protéines totales, acides aminés libres et acides aminés issus de la protéolyse) [25].

*Pham-van Tat (1961), du laboratoire de Bactériologie, a effectué un travail sur la réaction de fixation du complément appliquée à l'étude de la parenté sérologique des nucléoprotéines et des acides nucléiques correspondants de deux mollusques : *Mytilus edulis* L. et *Tapas decussatus* L. Il a confirmé les résultats connus : les RNP et DNP, injectées à l'animal, sont antigéniques, les ARN et ADN sont bien des haptènes [62].*

*Dans ce travail nous étudions les variations d'activité des phosphomonoestérases et l'évolution du taux des différents constituants phosphorés du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk au cours de son cycle biologique annuel. Ce sujet a été proposé par M. le professeur Monnier et nous avons réalisé les expériences dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de pharmacie de Montpellier, sous la direction de M. le professeur Monnier et M. le professeur Huguet et dans le laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences avec les conseils de M. le professeur Kahane.*

Nous rappellerons d'abord l'anatomie et la physiologie du manteau de la Moule et de l'appareil reproducteur qu'il renferme. Nous exposerons ensuite les techniques de dosage des constituants phosphorés et des phosphatases. Dans une troisième partie nous étudierons l'évolution des composés phosphorés au cours du cycle annuel de la Moule et, enfin, nous discuterons de la relation entre l'activité des phosphatases et les différentes phases de ce cycle biologique.

CHAPITRE PREMIER

LA MOULE

Nous étudierons tout d'abord, l'anatomie et la physiologie de ce mollusque lamellibranche et ensuite nous décrirons brièvement les conditions dans lesquelles ont été prélevés et transportés ces coquillages.

A. — ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE.

La Moule fait partie de la famille des mytilidés à coquilles équivalves, cunéiformes, sans échancrures pour le passage du byssus, munis d'un ligament linéaire marginal et à glande génitale répandue dans les deux lobes du manteau.

Nous nous intéressons uniquement à la Moule méditerranéenne ou Moule de Provence : *Mytilus galloprovincialis* Lmk. La Moule de Provence qui se trouve à l'état libre, en particulier dans les gisements naturels de Port-Vendres, de la Nouvelle, du bassin de Thau, de Martigues, de Berre et de Toulon [43], est l'objet d'une culture active dans certaines de ces stations. Nous avons opéré sur la Moule de culture du bassin de Thau.

Nous limitons la description anatomo-physiologique au manteau de la Moule et en particulier à l'appareil reproducteur qui se développe dans cette partie.

Les organes génitaux de la Moule n'occupent pas exclusivement la bosse de polichinelle mais se développent, également, dans les lobes du manteau. Les sexes sont séparés — les deux orifices génitaux se trouvent placés symétriquement de chaque côté de la ligne médiane — et ceci indique qu'on a affaire à un organe morphologiquement pair, mais chez l'adulte, la fusion est complète entre les deux parties.

La glande mâle et la glande femelle ont la même position relative et sont dépourvues de glandes annexes. Elles sont constituées par une glande acineuse à caecums très ramifiés. Toutes ces ramifications finissent par constituer un oviducte de chaque côté et ce sont ces derniers que l'on distinguera par transparence dans l'épaisseur du manteau et de la bosse génitale. Ces oviductes s'ouvrent par un orifice distinct sur une papille commune avec l'orifice rénal du côté extérieur de la commissure viscérale [42].

A l'approche de la période de reproduction, les glandes génitales se développent, elles pénètrent dans la bosse de polichinelle, dans le manteau et jusque dans le pied, en acquérant un volume tel que tous ces organes — à l'exception des branchies — sont noyés dans leur masse hypertrophiée.

La fécondation de l'œuf s'effectue selon deux processus : à l'intérieur des valves de la Moule, ou bien dans l'eau de mer entre éléments reproducteurs libres. Ce deuxième processus est rare mais il a pu être observé expérimentalement dans un certain nombre de cas. Nous décrivons seulement le processus de la fécondation normale.

Au moment de leur maturité, les spermatozoïdes sont libérés sous forme de deux jets blanchâtres et sont portés par l'eau de mer jusqu'aux organes femelles où ils sont retenus. Ils s'introduisent dans la cavité palléale où s'effectuera la fécondation.

La fécondation effectuée, les œufs se développent principalement dans la cavité branchiale. L'œuf donne naissance à une larve qui est expulsée par la femelle. Grâce à son appareil cilié la larve nage pendant un certain temps dans l'eau de mer, puis se fixe et s'entoure d'une petite coquille. L'essaimage a lieu lorsqu'il y a un brusque changement de température et une diminution de salinité de l'eau. Ces deux conditions sont remplies au moment du changement de saison. Dans le bassin de Thau les larves sont libérées vers les mois d'octobre et novembre. Enfin, il faut signaler que chez *Mytilus galloprovincialis* Lmk la période de reproduction est d'une très longue durée.

B. — PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT DES COQUILLAGES.

A chaque date prévue pour les prélèvements, nous nous sommes rendue sur les lieux de pêche, à Mèze, dans l'exploitation de M. Rouvière qui, avec une amabilité toujours égale, a pris le soin d'effectuer les prélèvements régulièrement dans le même secteur. Nos lots sont ainsi sensiblement homogènes; nous recueillons toujours des animaux à peu près de même âge (2 ans environ) et de même taille et nous pouvons ainsi comparer les différents résultats.

Nous plaçons les moules dans des bocaux contenant de l'eau de mer et nous les transportons très rapidement au laboratoire. Nous opérons la dissection de ces moules dès leur arrivée au laboratoire, soit deux heures après la pêche pour l'étude des phosphatases et sept heures après la pêche pour l'étude des constituants phosphorés.

CHAPITRE II

TECHNIQUES DE DOSAGE UTILISEES

Nous verrons d'abord les techniques de dosage des différents constituants phosphorés, puis nous décrirons les techniques employées pour le dosage des phosphatases.

A. — SÉPARATION ET DOSAGE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS PHOSPHORÉS.

Pour séparer les différents groupes de composés phosphorés, nous utilisons la technique de Schmidt et Thannhauser, modifiée par Schneider [71]. Nous obtenons, ainsi, des fractions : acido-soluble (fraction 1), lipidique (fraction 2), ribonucléique : ARN (fraction 3), désoxyribonucléique : ADN (fraction 4) et une fraction non extractible qui doit contenir les phosphoprotéines (fraction 5).

Après minéralisation sulfo-nitro-perchlorique [35], nous dosons dans chacune de ces fractions le phosphore total par colorimétrie, d'après la technique de Machøbæuf et Delsal [52].

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des lots identiques de moules prises et traitées dans les mêmes conditions. Les moules sont ouvertes et les manteaux sont séparés et essuyés à l'aide de papier filtre puis broyés avec un broyeur mécanique (Ultra-Turrax).

Des prises d'essai de 1 g et 2 g du broyat obtenu sont traitées à la température de 40° C par 20 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax. Après centrifugation à 0°C, le surnageant, qui constitue la fraction acidosoluble, est séparé par décantation. Ces extractions sont répétées deux fois (on opère à froid pour éviter toute dégradation secondaire). Les extraits réunis, portés à 100 ml avec de l'eau distillée, constituent la fraction 1 sur laquelle on dose les orthophosphates, le phosphore total acidosoluble et le phosphore thermolabile.

Le culot de centrifugation provenant de la séparation des acido-solubles est traité par 25 ml d'un mélange alcool-éther (3/1). Après centrifugation immédiate à 0° C le surnageant est séparé par décantation. Ces opérations sont répétées deux fois. Les liquides décantés sont réunis et forment la

fraction 2 sur laquelle, après élimination du solvant et minéralisation, on dose le phosphore lipidique.

Le résidu est mis à digérer dans 25 ml de potasse N à 37° C pendant seize à dix-huit heures jusqu'à dissolution complète. Le liquide est amené à pH 7 à l'aide d'acide chlorhydrique 6 N, puis on ajoute de l'acide trichloracétique à 5 p. 100 jusqu'à floculation et l'on centrifuge. Le surnageant est séparé par décantation et le dépôt lavé à l'acide trichloracétique à 5 p. 100 est centrifugé de nouveau. Les deux surnageants réunis sont portés à 100 ml et forment la fraction 3. Cette dernière contient l'ARN dont le phosphore est dosé après minéralisation.

Le floculat trichloracétique formant le culot est traité pendant 30 minutes à 90° C par 20 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100. La solution refroidie est centrifugée, le surnageant est séparé par décantation et le résidu, lavé à l'acide trichloracétique à 5 p. 100, est centrifugé à nouveau. Les deux surnageants réunis forment la fraction 4 contenant l'ADN dont le phosphore est dosé après minéralisation.

Le résidu insoluble résultant des opérations précédentes forme la fraction 5. Après minéralisation ce résidu donne le phosphore des phosphoprotéines et des autres composés phosphorés qui résistent à l'extraction.

Le dosage direct des orthophosphates de la fraction 1 est rendu impossible par un trouble insoluble et infiltrable dû à la présence de l'acide trichloracétique. Il s'agissait donc d'éliminer ce trouble sans toucher au phosphore. Nous avons utilisé la poudre de cellulose (Hyflo-supercel) qui remplit le mieux ces conditions. La cellulose utilisée donnant une réaction positive au bleu de molybdène, nous l'avons préalablement traitée pour éliminer cet inconvénient. Après digestion à l'ébullition dans de l'acide chlorhydrique concentré, la cellulose est ensuite traitée à l'acide trichloracétique à 50 p. 100 jusqu'à disparition de la réaction au bleu de molybdène. Elle est enfin lavée à l'eau jusqu'à disparition de toute trace d'acide.

50 ml de la fraction 1 sont filtrés sous pression réduite sur un buchner à travers une couche de cellulose de 2 cm d'épaisseur lavée au préalable avec 20 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Cette opération est répétée 3 fois, puis la cellulose est lavée à nouveau avec 20 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et à l'eau distillée jusqu'à disparition de toute trace de phosphore dans l'eau de lavage. Les extraits limpides ainsi obtenus sont portés à 100 ml.

Nous avons dosé sur cette solution les orthophosphates (P_i), le phosphore acido-soluble total (P_{ast}) et le phosphore thermolabile (P_{th}). Les orthophosphates sont dosés directement sur la solution, les phosphates thermo-

labiles sont déterminés par différence entre le taux de P observé après sept minutes d'hydrolyse à 100° C en milieu sulfurique normal (*P_h*) et les orthophosphates (*P_i*), le phosphore acido-soluble total après minéralisation de 20 ml de la solution.

Nous définirons le phosphore organique (*P_o*) par la différence entre le phosphore acido-soluble total et les orthophosphates (*P_i*) :

$$\begin{aligned} P_o &= P_{ast} - P_i \\ P_{th} &= (P_h - P_i). \end{aligned}$$

B. — TECHNIQUES DE DOSAGE DES PHOSPHATASES.

1. Méthode de Bodansky [11]

Elle a été la première méthode essayée pour notre travail parce qu'elle est la plus couramment utilisée notamment au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie.

Le principe est basé sur le dosage de l'acide phosphorique libéré par l'enzyme agissant sur le β glycérophosphate.

A 10 ml de substrat tamponné porté à 37° C on ajoute 0,5 ml d'extrait de moules (voir page 00). Après une heure d'incubation à 37° C on ajoute 9 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On filtre au bout de quelques minutes. Contrairement à ce qu'on observe pour le sérum, au lieu d'un précipité on obtient dans le cas d'extrait de moules un trouble infrangible quelle que soit la concentration d'acide trichloracétique utilisé. La méthode de Bodansky n'est pas de ce fait utilisable.

Nous avons d'autre part remarqué que lorsqu'on met 0,5 ml d'extrait de moules en présence de 10 ml de tampon de *pH* croissant, l'intensité du trouble diminue lorsque le *pH* augmente. La solution devient parfaitement limpide au-dessus de *pH* 10. Pour cela nous avons comparé les lectures au colorimètre des solutions portées à différents *pH* par rapport à l'eau distillée et nous avons constaté qu'au-dessus de *pH* 10 l'indication du colorimètre était identique à celle de l'eau distillée. Ces résultats nous ont incitée à choisir une méthode de dosage à la fin de laquelle on passe en milieu alcalin, nous avons choisi la technique de Huggins et Talalay [31].

2. Méthode de Huggins et Talalay [31]

a) Principe :

Il est basé sur le dosage colorimétrique de la phénolphtaléine libérée par l'enzyme agissant sur le phénolphtaléine diphosphate sodique. A la fin de la réaction et en vue de la mesure, l'enzyme est inhibé par l'addition (voir page 00) = page 48

d'un tampon alcalin approprié contenant un inhibiteur des phosphatases.

b) *Réactifs :*

- Solution mère de phénolphtaléine diphosphate à 1,52 g/l.
- Substrats tamponnés : la composition des solutions de substrats tamponnés utilisées est la suivante :
 - de pH 3,4 à pH 6,5 : solution à 0,304 mg/ml de phénolphtaléine diphosphate en milieu acide citrique-citrate de sodium 0,05 M [15].
 - de pH 7,0 à pH 9,0 : solution à 0,304 mg/gl de phénolphtaléine diphosphate en milieu barbital sodique — HCL 0,025 M [15].
 - de pH 9,0 à pH 10,6 : solution à 0,304 mg/ml de phénolphtaléine diphosphate en milieu glyocolle — Na OH 0,025 M [15].
- Tampon de fin de réaction. Cette solution est préparée en mélangeant 9,19 g de glyocolle, 7,17 g de chlorure de sodium, 15 ml d'une solution concentrée de soude (100 g de soude « exempte de carbonate » plus 100 ml d'eau distillée) et 10 g de pyrophosphate de sodium à 10 molécules d'eau et on complète à un litre. Le pH de ce tampon est 11,2.
- Solution mère de phénolphtaléine.
100 mg de phénolphtaléine sont dissous dans 100 ml d'alcool éthylique 95°.

c) *Protocole opératoire.*

Des tubes à essai renfermant chacun 5 ml de la solution de substrat tamponné (à pH croissant de 3,4 à 10,6) sont mis au bain-marie à 37° C pendant 5 minutes. On ajoute à chaque tube 0,5 ml de l'extrait phosphatasique et on laisse incuber pendant une heure à 37° C puis on ajoute 4,5 ml de tampon de fin de réaction conservé à 4° C. On obtient ainsi un mélange final dont la température est voisine de celle du milieu ambiant de sorte qu'on peut passer immédiatement au colorimètre. Pour chaque pH on prépare un témoin colorimétrique : à 5 ml de la solution de substrat tamponné on ajoute 0,5 ml d'extrait phosphatasique et aussitôt 4,5 ml de tampon de fin de réaction. On règle pour chaque pH le zéro de l'appareil à l'aide de ces solutions.

d) *Courbe d'étalonnage de la phénolphtaléine.*

On prépare des dilutions de la solution mère de phénolphtaléine

comprises entre 0,5 ml et 3 ml p. 100. A 5 ml de chaque solution on ajoute 0,5 ml d'extrait phosphatasique de moules et 4,5 ml de tampon de fin de réaction. L'intensité de la coloration est déterminée au colorimètre immédiatement après mélange. On établit la courbe d'étalonnage de la phénolphtaléine comme suit : on porte en abscisses le nombre de mg de phénolphtaléine et en ordonnées les densités optiques. La courbe obtenue est une droite (figure 1).

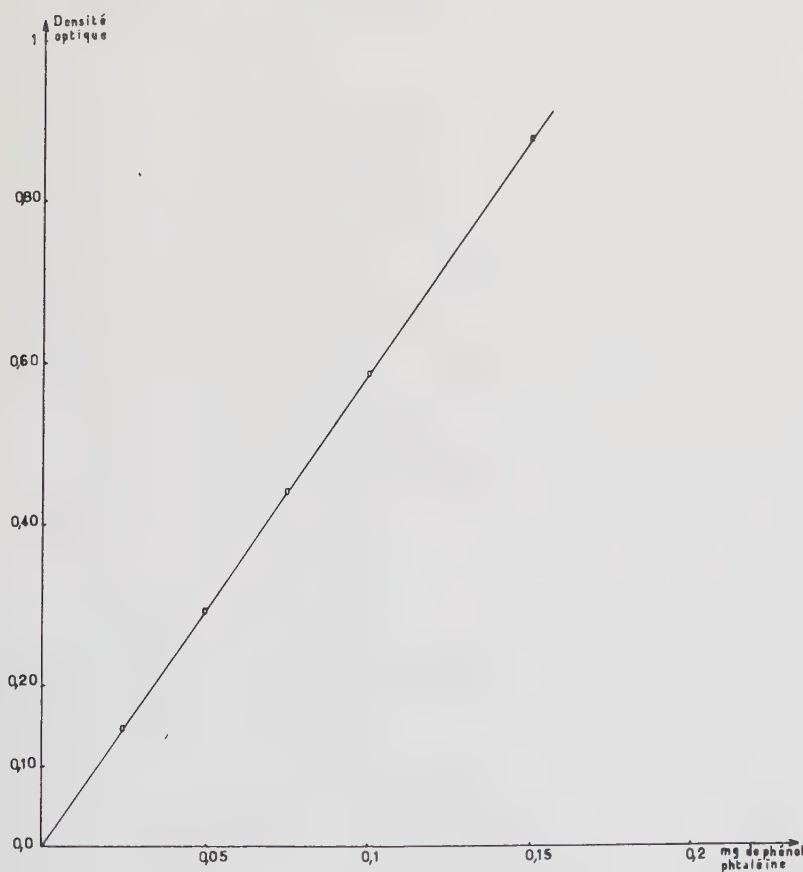


Fig. 1 Courbe d'étalonnage de la phénolphtaléine

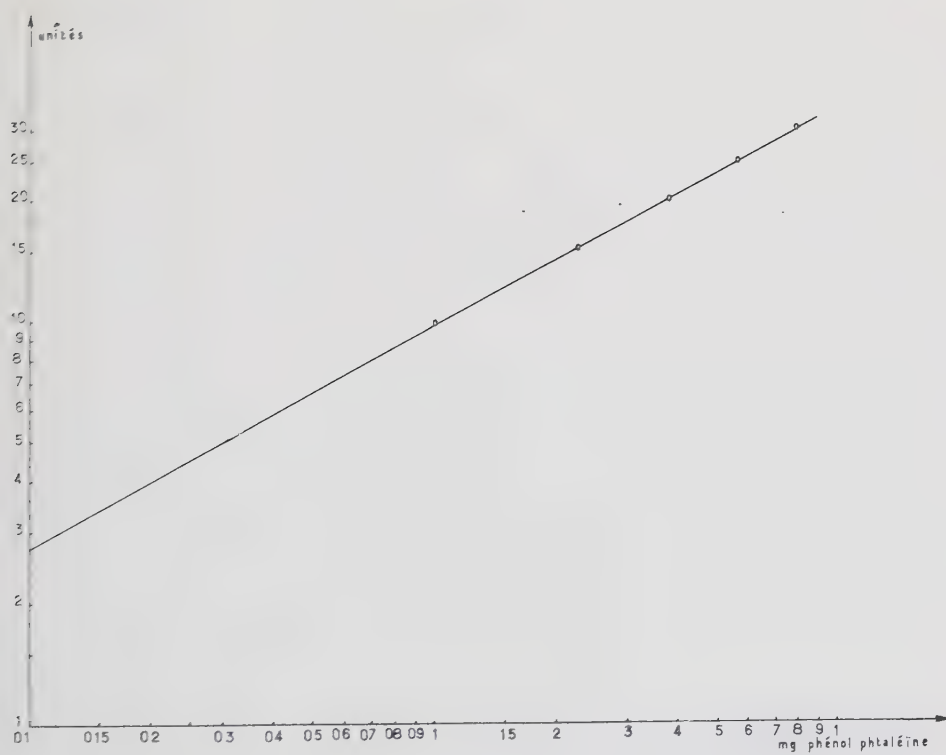


Fig. 2 Courbe de système d'unités

c) Définition du système d'unités phosphatasiques.

D'après Huggins et Talalay : 10 unités de phosphatase acide ou alcaline représentent la quantité d'enzyme qui libère l'équivalent colorimétrique d'un mg de phénolphtaléine à partir d'un excès de phénolphtaléine diphosphate, en une heure, à 37° C dans les conditions optima de pH.

Dans toutes les méthodes de dosage des phosphatases on présume que la quantité des produits d'hydrolyse formés dans des conditions standards est proportionnelle à la concentration d'enzyme pourvu qu'on utilise un excès de substrat. Ceci a été confirmé pour les quantités d'orthophosphate libérées à partir de monophénylphosphate disodique en faisant varier dans une large échelle la concentration d'enzyme. Huggins et Talalay signalent que dans le cas d'hydrolyse enzymatique du phénolphtaléine diphosphate, la relation entre la quantité d'orthophosphate libérée et la concentration de l'enzyme est une ligne droite mais la relation entre la quantité de phénolphtaléine libérée (déterminée par colorimétrie) et la concentration de l'enzyme est une courbe parabolique. La raison de cette contradiction entre la quantité d'orthophosphate libérée et celle de phénolphtaléine n'est pas connue. D'après ces auteurs elle paraît due à l'existence de deux produits d'hydrolyse du phénolphtaléine diphosphate. Si on représente les variations du logarithme de la concentration de l'enzyme en fonction du logarithme de la quantité de phénolphtaléine (exprimée en mg) déterminée par colorimétrie, on obtient une ligne droite.

Pour l'obtention de la courbe d'étalonnage, nous avons opéré comme suit : à partir de dilutions d'extraits phosphatasiques de moules (2 p. 100 à 15 p. 100), nous avons déterminé la concentration qui libère 1 mg de phénolphtaléine à 37° C pendant une heure au pH optimum à partir d'un excès de phénolphtaléine diphosphate. Nous constatons que cette concentration est égale à 4 p. 100. 100 ml d'une solution à 4 p. 100 d'extrait phosphatasique de moules contiennent donc 10 unités; 100 ml d'une solution à 6 p. 100, 15 unités; 100 ml d'une solution à 8 p. 100, 20 unités; 100 ml d'une solution à 10 p. 100, 25 unités; 100 ml d'une solution à 12 p. 100, 30 unités, etc...

Pour chaque dilution de l'extrait nous avons déterminé la quantité de phénolphtaléine libérée, puis nous avons représenté sur un papier logarithmique les variations du nombre d'unités phosphatasiques en fonction de la quantité de phénolphtaléine libérée exprimée en mg. La courbe obtenue (figure 2) est une ligne droite. Elle permet de déterminer le nombre d'unités phosphatasiques au pH optimum contenu dans un extrait de moules d'après la quantité de phénolphtaléine libérée exprimée en mg.

3. Justification de la technique

a) Stabilité de la solution substrat-tamponné.

La phénolphthaléine diphosphate utilisée renferme une certaine quantité de phénolphthaléine libre. Nous avons jugé nécessaire de vérifier si cette quantité de phénolphthaléine est constante ou bien s'il y a hydrolyse au cours du temps. A 5 ml de solution substrat-tamponné nous ajoutons 5 ml de tampon de fin de réaction. Le mélange est passé immédiatement au colorimètre, en prenant comme témoin de l'eau distillée. Nous avons trouvé que la densité optique du tampon ne varie pas pendant les quatre premiers jours qui suivent la préparation de la solution, elle augmente très légèrement du cinquième au septième jour, puis plus rapidement à partir du huitième jour. Ce qui indique une légère hydrolyse du phénolphthaléine diphosphate au cours du temps.

b) Reproductibilité des résultats.

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, nous avons effectué plusieurs dosages de l'activité phosphatasique sur différents extraits de pH 4,0 ; 4,4 ; 5,4. Nous donnons quelques résultats sur le tableau I. Ceux-ci montrent un écart compris entre 3,4 p. 100 et 7,7 p. 100, démontrant la validité de la technique.

TABLEAU I
REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

pH	1 ^{er} dosage	2 ^e dosage	3 ^e dosage	M	X
1 ^{er} Extrait					
4,0	1,25	1,35	1,30	1,30	3,8
4,4	1,40	1,50	1,44	1,45	3,4
5,4	0,61	0,69	0,64	0,65	6,0
2 ^e Extrait					
4,0	1,20	1,40	1,30	1,30	7,7
4,4	1,55	1,40	1,50	1,48	5,4
5,4	0,70	0,78	0,77	0,75	6,6
3 ^e Extrait					
4,0	1,10	1,20	1,14	1,15	4,3
4,4	1,45	1,55	1,50	1,50	3,3
5,4	0,61	0,55	0,59	0,58	5,0

Résultats exprimés en mg de phénolphthaléine.

M : La moyenne arithmétique des valeurs.

X : Écart maximum p. 100 par rapport à la moyenne arithmétique.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS PHOSPHORÉS

A. — GÉNÉRALITÉS.

L'ubiquité du phosphore est un fait bien établi, tous les tissus quels qu'ils soient fournissent à l'incinération un résidu de cendres plus ou moins abondant contenant toujours de l'acide phosphorique. Le phosphore se trouve dans le monde vivant sous forme minérale mais surtout organique (phospholipides, phosphoprotéines, phosphoglucides, acides nucléiques, etc...).

Les travaux réalisés sur le phosphore chez les mollusques sont peu nombreux et ils concernent en général l'étude du phosphore total dans l'organisme entier.

Chez *Modiolus demessus* adulte, Kuenzler [40] observe une variation saisonnière du taux du phosphore total dans l'animal entier. Le maximum est enregistré en septembre au moment du frai et le minimum en novembre et durant tout l'hiver. Kishimoto [39] a mis en évidence la présence d'ATP dans les muscles adducteurs de *Mytilus* et *Modiolus*. Florkin, Lecrenier et Zangerle [23] ont déterminé la concentration du calcium et du phosphore dans le plasma, le liquide péricardique et le liquide des néphridies de l'Anodonte. Povelyagina et Telichenco [63] ont étudié la concentration du phosphore radioactif expérimental et d'autres éléments radioactifs chez les mollusques d'eau douce.

Peu de renseignements sont donc donnés sur la répartition des différents constituants phosphorés et sur leur variation saisonnière. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'étudier les différentes formes du phosphore et leurs variations au cours du cycle annuel dans le manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk adulte (2 ans).

B. — ÉTUDE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS PHOSPHORÉS DE LA MOULE.

Les moules qui ont servi à nos expériences ont été pêchées au bassin de Thau aux dates suivantes :

1962 : 1^{er}5 janvier, 15 février, 15 mars, 17 avril, 17 mai, 15 juin, 12 juillet,

16 août, 13 septembre, 13 octobre, 17 novembre, et 13 décembre.

1963 : 28 janvier et 16 février.

Nous opérons nos extractions en double sur deux échantillons de broyat de manteau de 1 g et de 2 g suivant le mode opératoire indiqué au chapitre des techniques (page 00). Nous obtenons ainsi les fractions : acido-soluble, lipidique, nucléique (ARN et ADN) et une fraction contenant le phosphore résiduel ayant résisté aux différentes extractions et qui renferme probablement les phosphoprotéines. Nous dosons dans chacune de ces fractions les différentes formes de phosphore.

1. Phosphore acido-soluble

Nous pouvons distinguer dans la fraction acido-soluble trois formes de phosphore : les orthophosphates (*P i*), le phosphore organique (*P o*) et le phosphore thermolabile (*P th*). La minéralisation de l'extrait acido-soluble total permet de déterminer le phosphore acido-soluble total (*P ast*).

La figure 3 représente les variations de ces différentes formes de phosphore acido-soluble au cours de la période février 1962-février 1963.

a) *Phosphore acido-soluble total.*

Le taux du phosphore acido-soluble total est minimum en février et mars (56 et 55 mg), il augmente brusquement entre juin et juillet (76 à 106 mg) pour atteindre un maximum en septembre (118 mg), puis il diminue rapidement de septembre à octobre (71,5 mg) et il reste peu variable entre novembre et février (68; 64; 73 et 69 mg).

b) *Les orthophosphates.*

Les variations des orthophosphates sont sensiblement parallèles à celles du phosphore acido-soluble total : minimum en février et mars (26 et 23,2 mg), ils augmentent brusquement entre juin et juillet (38,4 et 62 mg), atteignent un maximum en septembre (67,6 mg) puis diminuent brusquement de septembre à octobre (37 mg) et restent peu variables entre décembre et février (26; 24,8; 29 et 27 mg).

c) *Phosphore organique.*

Le taux du phosphore organique est pratiquement constant de mars à juin (30; 31,8; 32,6; 35 et 37,6 mg), il augmente entre juin et juillet (48 mg) et demeure pratiquement constant pendant juillet, août et septembre (48, 49 et 50,4 mg), il diminue de septembre à octobre (34,5 mg) puis il augmente en novembre et garde une valeur presque constante jusqu'en février (42; 39,2; 44 et 41,2 mg).

(voir page 00) = page 13

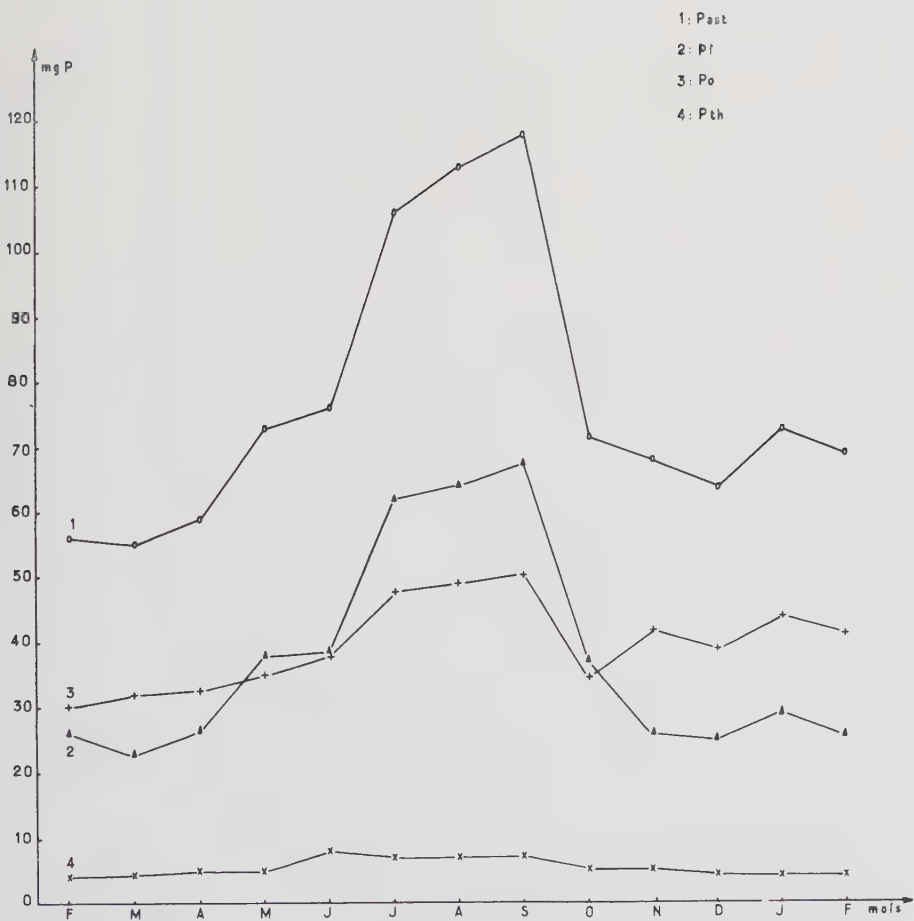


Fig. 3 Variations de différentes formes du phosphore acido-soluble pendant le cycle annuel

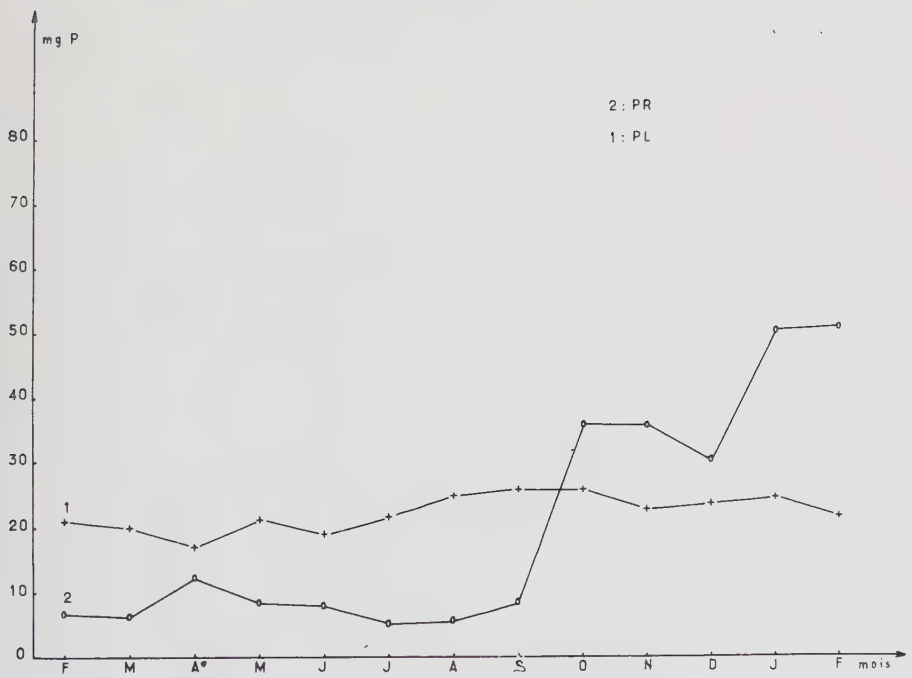


Fig. 4 Variations du taux de phosphore lipidique et résiduel pendant le cycle annuel

d) *Phosphore thermolabile.*

Les variations du phosphore thermolabile sont faibles mais il peut être intéressant de remarquer une légère augmentation durant les mois de juin, juillet, août et septembre (7,8; 6,8; 7,0 et 7,1 mg).

L'examen des courbes de la figure 3 montre qu'il y a une augmentation brusque du taux de phosphore acido-soluble particulièrement marquée pour le phosphore acido-soluble total et les orthophosphates, avec un maximum en septembre et une diminution brusque de septembre à octobre. Nous devons remarquer que la période entre juin-septembre est très importante dans la vie de l'animal. D'après Lubet [47] les mois de juillet et août (les plus chauds de l'année) correspondent à l'accumulation des réserves chez la Moule et le mois de septembre à l'élaboration des gamètes, sous réserve d'un abaissement de la température de l'eau au-dessous de 20° C [48].

2. Phosphore lipidique

Les variations du phosphore lipidique sont représentées par la figure 4 (courbe 1). La courbe montre que le taux de cette forme de phosphore varie peu. Les valeurs maximales sont observées en août, septembre et octobre (25, 26 et 26 mg) et les valeurs minima en avril (16,9 mg).

3. Phosphore nucléaire

Les variations du phosphore nucléaire sont représentées par la figure 5.

a) *Phosphore de l'ARN.*

Son taux est minimum entre avril et juillet (25; 25; 24 et 25 mg), il augmente pour atteindre un maximum en octobre (47 mg) puis il diminue jusqu'à décembre (41 mg). En janvier et février 1963 nous avons observé une augmentation du taux du phosphore de l'ARN (44 et 51 mg).

b) *Phosphore de l'ADN.*

Il varie peu de février à août (2,3; 2,2; 3,6; 1,8; 2,9 et 2,2) il augmente d'août à septembre (5 mg) puis il reste constant jusqu'en décembre (5,0; 4,8; 4,4 et 4,5 mg). Comme dans le cas de l'ARN nous avons observé une augmentation du taux de l'ADN pour les mois de janvier et février 1963 (9,9 et 8,4 mg).

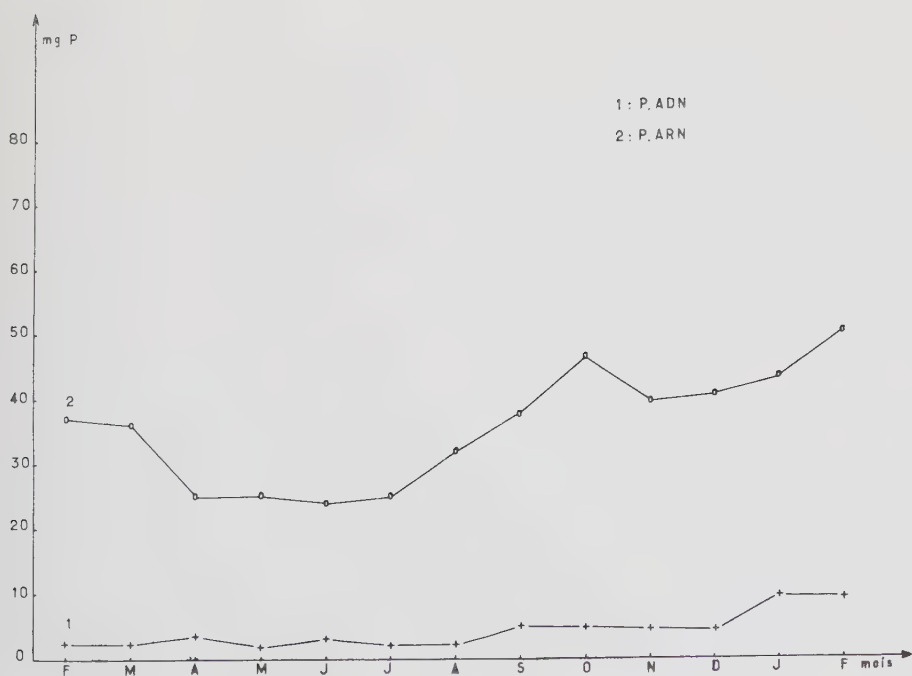


Fig. 5 Variations du taux de phosphore nucléique pendant le cycle annuel

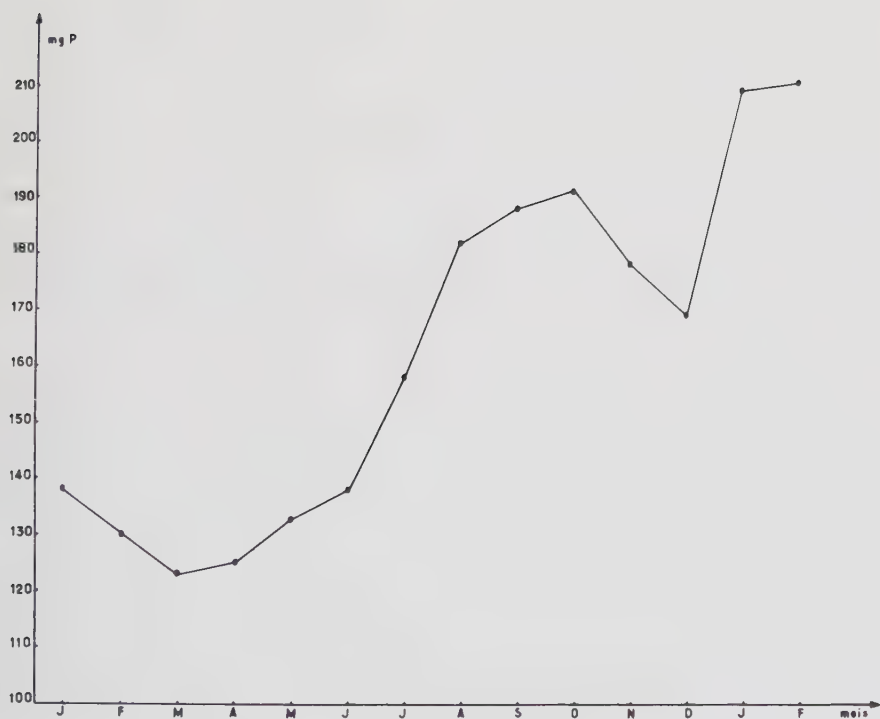


Fig. 6 Variations du taux de phosphore total pendant le cycle annuel

4. Phosphore résiduel

Les variations du phosphore résiduel sont représentées dans la figure 4 (courbe 2). Celui-ci varie peu de février à septembre (6,8; 6,3; 12,5; 8,6; 8,1; 5,0; 5,7 et 8,8 mg) avec un léger maximum en avril. Entre septembre et octobre il augmente notablement (36 mg) puis diminue légèrement en décembre (30,8 mg). En janvier et février 1963 nous avons observé une augmentation considérable (51 et 51,5 mg) du taux de phosphore résiduel. Les valeurs trouvées étant considérablement plus grandes que celles du mois de février 1962.

5. Phosphore total

Les variations du phosphore total sont représentées par la figure 6. De janvier à mars le taux du phosphore diminue régulièrement (138; 130; 123,5 mg), il augmente de mars à octobre de façon plus marquée pour les mois de juillet, août, septembre et octobre (163,5; 182; 188 et 191 mg) puis le taux diminue entre octobre et décembre (191; 178; et 169 mg). En janvier et février 1963 nous avons noté une augmentation importante du taux de phosphore total (209 et 210 mg).

Les résultats que nous avons exposés sont récapitulés dans le tableau II. Les chiffres portés dans ce tableau représentent la moyenne arithmétique des résultats obtenus sur des prises d'essais doubles de broyat de 1 g et 2 g. Les écarts maxima par rapport à cette moyenne sont inférieurs à 5 p. 100.

C. — DISCUSSION.

Nous allons comparer nos résultats à ceux signalés dans la littérature, bien que ces derniers soient relatifs aux variations du phosphore total de l'organisme entier, et, les nôtres à celles du phosphore total du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

Escot-Molinié [22] a déterminé le phosphore total durant les mois de l'année où les moules sont les plus appréciées (juin à novembre). Ces résultats portent sur les années 1953 et 1954 et figurent sur le tableau III. Ils mettent en évidence une augmentation du phosphore total entre juin et juillet, mais nous remarquons une variation très importante entre le taux de phosphore d'une année à une autre pour certains mois. Ce qui semble indiquer que les moules sont influencées par les variations atmosphériques et celles du milieu (l'année 1953 est sèche et 1954 est pluvieuse).

TABLEAU III

VARIATION DU TAUX DU PHOSPHORE TOTAL
CHEZ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* Lmk
DANS L'ORGANISME ENTIER
(Escot-Molinié [22])

1953	P	1954	P
Juin	1 171,4	Juin	1 154,2
Juillet	1 412,9	Juillet	1 554,3
Juillet	1 424,4	Septembre	1 329
Septembre	714,7	Octobre	1 384
Octobre	777	Octobre	1 318
Octobre	702	Novembre	1 144,5
Novembre	1 005	Novembre	1 421,2

Résultats donnés en mg pour 100 g de matière sèche.

Kuenzler [40] a obtenu un taux maximum du phosphore total pendant le frai (septembre) et en octobre ce qui concorde avec nos résultats .

Vinogradov [74] a rassemblé des résultats concernant la teneur de nombreux éléments chez les organismes marins. On y trouve peu de renseignements relatifs au phosphore. Chez *Mytilus edulis* le taux de phosphore est de 170 mg p. 100 g de matière fraîche, mais la période de l'année où ces dosages ont été effectués n'est pas indiquée, ce qui rend délicate la comparaison de ces résultats avec les nôtres. Cependant nous remarquons que nous obtenons des valeurs analogues pour les mois de juillet (163,5 mg), novembre (171 mg) et décembre (169 mg).

Lors de la détermination du phosphore total pour les mois de janvier et février 1963, nous notons des taux élevés et qui n'ont été obtenus à aucun mois de l'année 1962. Les dosages du phosphore résiduel, du phosphore nucléique présentent également une hausse notable. Or les mois de janvier et février 1963 correspondent à la vague de froid ayant sévi en Europe (— 17° C à Montpellier).

Nous donnons sur le tableau IV les températures de l'eau du bassin de Thau durant la période de notre expérimentation. Nous notons une température très basse de l'eau en janvier et février 1963 (2°3C et 4° C) par rapport aux valeurs habituelles (6 à 9° C).

TABLEAU IV
TEMPÉRATURE DE L'EAU DU BASSIN DE THAU
1961

14-VI-61	15-IX-61	17-XI-61	12-XII-61
19°8	23°8	9°8	10°

1962

9-I-62	20-II-62	22-III-62	8-V-62	3-VII-62	27-VII-62
7°9	6°4	6°6	17°5	23°	24°5
18-VIII-62		27-IX-62	17-X-62	29-XI-62	
23°6		18°2	17°	7°6	

1963

25-I-63	12-II-63
2°3	4°

Or Lubet, étudiant expérimentalement l'action de la température sur l'émission des gamètes, montre qu'au-dessous de 8° C on n'observe pas d'émission de gamètes mûrs chez la Moule. Il a observé un arrêt total d'émission de gamètes lors de la vague de froid qui a sévi en février 1956.

Il a montré d'autre part que chez la femelle si la ponte est empêchée par une température trop basse des eaux « Les oocytes mûrs qui n'ont pas été émis entrent alors en lyse et finissent par former des amas syncytiaux qui se dissocient rapidement. On peut observer des gonoductes remplis par une véritable « bouillie » qui semble être résorbée *in situ*. On pourrait hypothétiquement interpréter ce processus de « résorption-récupération » comme une défense de l'organisme dans certaines conditions défavorables, résorption qui permettrait de libérer des métabolites bloqués dans les oocytes » [49]. De plus il a montré que le froid empêche la ponte mais n'agit pas sur la gamétogénèse [46].

D'après ces observations nous pouvons conclure qu'une interprétation des résultats obtenus durant les mois de janvier et février 1963 est impossible, du fait que les moules se trouvent dans des conditions inhabituelles.

D. — INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE.

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence l'importance de la période juillet-septembre dans le cycle annuel de la Moule. C'est en effet durant cette période que l'on observe une augmentation de la plupart des composés phosphorés étudiés. On sait que cette période correspond d'une part à l'accumulation des réserves (glycogène et lipides) en juillet et août, d'autre part à l'élaboration des gamètes en septembre, puis à leur libération massive une fois mûrs en octobre ou en novembre selon les conditions du milieu (température et salinité). Cette libération massive de gamètes ne marque cependant pas la fin du cycle biologique sexuel de la Moule de Provence. Au cours de notre étude nous avons noté une libération faible et continue des gamètes jusqu'en mars (1962). C'est sur la base de ces données que nous allons essayer d'interpréter nos résultats.

1. Phosphore acido-soluble

Les variations du phosphore acido-soluble au cours du cycle annuel se caractérisent par une forte augmentation de la teneur en orthophosphates durant la période juillet-septembre. La mise en réserve du glycogène pendant la période d'accumulation des réserves pourrait expliquer cette augmentation des orthophosphates si on admet que le glycogène se forme à partir des esters phosphoriques du glucose avec libération d'orthophosphates. La diminution du taux d'orthophosphates observée en octobre après libération de la majeure partie des gamètes pourrait s'expliquer du fait que ces derniers sont riches en orthophosphates. A partir du mois d'octobre nous notons une diminution faible des orthophosphates qui semble correspondre à une libération faible et continue des gamètes que nous avons signalée. En effet les émissions les plus tardives libèrent moins

de gamètes que les premières et chacune d'elle est suivie d'une diminution des réserves. Il y a resynthèse des réserves pendant le stade de restauration mais elles n'atteignent pas en moyenne les valeurs des cycles précédents. Il y a donc un appauvrissement successif en réserves jusqu'à la fin de la saison de reproduction (mars 1962).

2. Phosphore lipidique

La courbe de variation des phospholipides ne renseigne pas sur le métabolisme des constituants phospholipidiques, ni sur le rôle qu'ils jouent dans le cycle annuel de l'animal. Les valeurs maximales de la teneur en phospholipides s'étendent sur les mois d'août, septembre et octobre. Or la libération des gamètes n'a lieu qu'en octobre et nous retrouvons ce qui est déjà connu à savoir que les phospholipides sont des produits de constitution de la cellule.

3. Phosphore nucléaire

a) *Phosphore de l'ADN.*

Les variations de l'ADN ne sont pas assez importantes pour nous permettre de dégager des conclusions concernant sa participation dans le cycle biologique de la Moule. Le seul point important à noter est une augmentation du taux de l'ADN entre les mois de septembre à novembre qui coïncide avec la période d'activité sexuelle. Or on sait qu'au moment de la vitellogénèse, on observe la présence d'ADN dans les cellules sexuelles ainsi qu'un enrichissement de cytoplasme en ADN [50]. Ceci peut justifier l'augmentation du taux de l'ADN que nous avons observé pendant la période d'activité sexuelle. En janvier et février 1963 (vague de froid) nous avons observé des valeurs très importantes du taux d'ADN. Or on sait que le froid empêche la ponte mais n'interrompt pas la gamétogénèse, les gamètes mûrs ne pouvant pas être libérés sont lysés et libèrent alors des métabolites. Ce qui pourrait peut-être expliquer l'augmentation de l'ADN pendant la vague de froid.

b) *Phosphore de l'ARN.*

Le taux d'ARN augmente en septembre, c'est-à-dire au moment de la gamétogénèse, il atteint son maximum en octobre, moment où un nombre considérable des gamètes est libéré puis le taux diminue et reste constant pendant que dure la libération des gamètes. Nous pensons que l'augmentation du taux d'ARN est directement liée à l'activité des cellules sexuelles. En janvier et février 1963 il y a eu une légère augmentation d'ARN, ceci semblerait être dû aux perturbations des phénomènes sexuels par le froid comme nous l'avons signalé dans le paragraphe précédent.

4. Phosphore résiduel

Dans le phosphore résiduel nous admettons la présence du phosphore issu des protéines. Après la libération maximale des gamètes et durant toute l'émission nous avons remarqué une augmentation très importante du taux du phosphore résiduel. Lubet [45] signale que la teneur en protéines est minimum pendant le stade de repos sexuel et maximum au moment de la maturité sexuelle chez *Mytilus edulis* (mars). L'augmentation du phosphore résiduel pourrait alors être expliquée par une augmentation des phosphoprotéines. Cette augmentation durant l'émission des gamètes pourrait être due à certains constituants phosphorés des gamètes non mûrs qui auraient résisté aux extractions antérieures. Nos résultats montrent que le taux minimum du phosphore résiduel se situe pendant la période de repos sexuel (juillet et août) et sont comparables à ceux obtenus par Gras qui observe un taux minimum des protéines pendant la période juin à septembre [26]. L'augmentation du phosphore résiduel observée en janvier et février 1963 peut s'expliquer comme précédemment par la libération de métabolites des gamètes lysés.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DES PHOSPHATASES

A. — GÉNÉRALITÉS.

L'activité phosphatasique dans les tissus animaux et végétaux a été mise en évidence de 1907 à 1913 par divers chercheurs. En 1907 Suzuki, Yoshimura et Takaishi observèrent que certaines céréales libèrent de l'acide phosphorique à partir de la phytine [72] et que l'hydrolyse des glycérophosphates par les levures est un phénomène enzymatique [58]. 1923 est la date qui a donné un intérêt réel à l'action phosphatasique. C'est l'année où Robison [64] isola l'enzyme de l'os et démontra sa participation à l'ossification. C'est la période où la biochimie des esters phosphoriques a commencé à se développer et où les travaux de Harden et Young et de Neuberg faisaient pressentir le rôle capital joué par les esters hexose-phosphoriques dans le métabolisme intermédiaire des glucides. L'attention de nombreux chercheurs n'a cependant été retenue par les phosphatases que plus tard lorsque fut acquise la certitude de la participation des dérivés phosphorés à la glycolyse, à la glycogénolyse musculaire (Embden, Parnas, Meyerhof) et à la formation du sel de l'os (Robison).

L'une des raisons qui justifient le grand nombre des recherches consacrées à ces enzymes est l'étendue de leur répartition dans les micro-organismes, dans les végétaux chlorophylliens, les champignons et les tissus animaux. L'étude de ces enzymes présente par ailleurs une extrême complexité dans ses aspects biochimique et physiologique. En effet, la plupart des tissus animaux et végétaux renferment un mélange de phosphatases de pH optima divers ainsi que plusieurs enzymes spécifiques hydrolysant les différentes combinaisons naturelles phosphorées. Tableau V.

Dans ce travail nous ne nous occupons que des phosphomonoestérases et nous ne donnons des renseignements que sur les phosphomonoestérases de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

B. — APERÇU GÉNÉRAL SUR LES PHOSPHOMONOESTÉRASES.

1. Répartition

Les phosphomonoestérases sont très répandues dans la nature. On

TABLEAU V
CLASSIFICATION DES PHOSPHATASES
d'après J. Courtois et R. Perles [18]

a) *Phosphatases scindant une liaison oxygénée entre deux atomes de phosphore :*

Dénomination		Principaux substrats
Pyrophosphatases		Pyrophosphates et esters pyrophosphoriques
Polyphosphatases	Métaphosphatases	Tri, tétra et polymétaphosphates
	Adénosinétriphosphatase ou ATPase	ATP dégradé en ADP
	Apyrase	ATP et ADP dégradés en AMP

b) *Phosphatases scindant une liaison entre un atome de phosphore et un radical organique.*

Dénomination			Principaux substrats
Phosphoamidases			phosphamides d'amines cycliques et de dérivés guanidiques
Phospho- mono- estérases	Phosphomonoestérases à large spécificité		glycérophosphates, phénylphos- phates, phénolphtaléine phosphate
	Phospho- mono- estérase à spécificité préférentielle	Phytase	inositohexaphosphate
		Hexosediphosphatase	fructose-1-6-diphosphate
		Glucose-6-phosphatase	glucose-6-phosphate
		Nucléotidase	mononucléotide
	Phosphodiesterases		diphénylphosphate
Aldose-1-phosphatase		glucose-1-phosphate	
Acylphosphatase ou phosphoacylase		acétylphosphate	

les rencontre dans le rein, le foie, la muqueuse intestinale, la prostate, dans les bactéries les plus diverses, dans les moisissures, les champignons, les végétaux, les mollusques, etc... Leur champ d'action est très étendu. Elles hydrolysent *in vitro* les esters alcooliques et phénoliques les plus divers de la chimie organique. Ceci a été établi en grande partie par les écoles anglaise [37], [64], et japonaise [73], [5], [29], [33], [30]. Les travaux de Neuberg, Jacobson et Wagner [59] ont montré que dans l'organisme les phosphomonoestérases sont susceptibles de libérer l'acide phosphorique à partir des esters les plus divers.

On distingue 4 phosphomonoestérases selon le pH optimum d'action.

La phosphomonoestérase I dite alcaline :

son pH optimum est compris entre 8,8 et 9,4 selon le substrat qui lui est offert. Elle est très répandue dans la nature, particulièrement dans les tissus animaux.

La phosphomonoestérase II :

son pH optimum est compris entre 5,0 et 5,4, elle est très répandue chez les végétaux. Parmi les tissus animaux, le foie et la rate en sont particulièrement riches.

La phosphomonoestérase III :

son pH optimum est compris entre 3,9 et 4,2, elle est probablement présente dans de nombreux tissus animaux, où sa labilité est beaucoup plus grande que celle des autres phosphatases.

La phosphomonoestérase IV :

son pH optimum est compris entre 5,4 et 6,2, elle a été étudiée dans les levures (hautes et basses).

Quelques auteurs se sont intéressés aux phosphatases chez les mollusques. Nous pouvons citer l'étude : de la localisation des phosphatases acide et alcaline dans *Mytilus*, *Patella* et *Fissurella* [24], de la distribution de la phosphatase alcaline dans le manteau et le sac à perle de la moule d'eau douce [76], des phosphomonoestérases dans les muscles de *Mytilus edulis* [67], de l'activité phosphatasique chez *Haliotis tuberculata* L., *Helix pomatia* L., *Mytilus edulis* L., etc..., par P. Manigault [53], de l'activité phosphatasique de l'hémolymph de l'escargot par Latreille [44]. Enfin, les travaux histochimiques sur les phosphatases dans les diverticules et les amibocytes de *Lamellidens corrianus* [36] et dans certaines muqueuses des mollusques [32].

2. Effecteurs des phosphomonoestérases

L'action des enzymes peut être modifiée réversiblement par des corps dits effecteurs qui augmentent ou diminuent la vitesse d'hydrolyse. Les

enzymes sont en général accompagnés dans les tissus d'un système activateur et d'un système inhibiteur qui, dans le cas des phosphatases, sont très complexes.

L'étude des effecteurs a un intérêt double : d'une part elle permet de préciser la nature de ces effecteurs et les facteurs modifiant les actions phosphatasiques dans les cellules, d'autre part elle renseigne sur leur mode d'action, variable selon la phosphatase, menant ainsi à une nouvelle classification des phosphomonoestérases.

Les effecteurs sont très nombreux. Nous pouvons citer : l'ion magnésium et divers ions moins étudiés (manganèse, zinc, fer, cobalt, molybdates, fluorures), les thiols, les acides aminés, etc...

a) *Action de l'ion magnésium.*

Elle n'est pas la même sur les quatre phosphatases. La phosphomonoestérase I alcaline purifiée (rein) est activée par l'ion magnésium [34]. Les phosphomonoestérases II, III et IV, se comportent tout autrement. L'enzyme II du foie, du rein [8] et des graines de moutarde [16] est insensible à l'ion magnésium. Cette même phosphatase des graines d'amande douce [16], des basidiomycètes [60] et du sérum [51] est plus ou moins fortement inhibée par cet ion. L'enzyme III des levures hautes [4] et des basidiomycètes est inhibée par les sels de magnésium, alors que l'enzyme IV des levures [70] et des hématies [66] est activée.

Le mécanisme d'action du magnésium est complexe. Cet ion exerce dans certains cas un effet protecteur vis-à-vis de l'inhibition due aux ions phosphates libérés par hydrolyse du substrat [27], [28], [2], [3], [65]. Par ailleurs, il se combine aux enzymes et certains auteurs le considèrent comme un de leurs constituants. Le rôle de cette combinaison dans l'activité catalytique des phosphatases est défini : le magnésium augmente l'affinité de la phosphomonoestérase alcaline pour le substrat, tandis qu'il diminue celle de la phosphomonoestérase acide II (basidiomycètes) [65].

b) *Action des autres ions métalliques.*

Pour des concentrations comprises entre M/1 000 et M/100, les sels de métaux lourds inhibent presque tous les enzymes. Il faut remarquer, cependant, que leurs effets à des taux plus faibles n'ont pas pu être étudiés d'une manière satisfaisante sur des phosphatases définies, soigneusement purifiées, ou tout au moins séparées des enzymes isodynamiées. Il y a, parfois, des contradictions dans les résultats obtenus : d'après Bamann [6], [7], l'ion manganèse est susceptible d'activer considérablement la phosphomonoestérase alcaline, par contre Albers ne le considère pas comme un activateur [1] et Cloetens [12], [13], [14], Massart et Duffait [57] ont obtenu

des activations moindres mais très nettes des phosphomonoestérases du foie, du rein, de la rate et des levures. L'ion cobalt est à cet égard moins actif. L'ion fer et l'ion zinc sont des inhibiteurs faibles après dialyse prolongée. Cependant, en présence d'acides aminés, en particulier d'alanine, le zinc devient activateur de la phosphomonoestérase intestinale. L'ion calcium exerce un effet activateur sur la phosphomonoestérase alcaline purifiée, il est sans action sur les phosphomonoestérases acides. C'est un puissant activateur de l'enzyme III du soja, mais il ne présente aucune action sur l'enzyme III des basidiomycètes [61].

c) Action des fluorures et des oxalates.

Les oxalates et plus encore les fluorures sont de puissants inhibiteurs de certaines phosphomonoestérases acides animales [10] et végétales [16], et plus particulièrement des phosphomonoestérases II de la prostate [41] du foie et du rein. L'inhibition serait due, en partie du moins, à la formation de complexes fluorés avec les ions métalliques activateurs de l'enzyme.

d) Autres activateurs et inhibiteurs.

L'ion phosphate, produit de l'hydrolyse phosphatasique de tous les substrats est le seul inhibiteur général des phosphatases. De ce fait, il participe à la régulation physiologique de l'activité de ces enzymes.

Les acides aminés modifient l'activité enzymatique des phosphatases. Aebi et Abelin ont trouvé que l'acide glutamique (L), le glycofolle et la lysine (L) diminuent l'activité phosphatasique des préparations de tissu rénal. L'inhibition est maximum pour les acides aminés basiques et minimum pour les acides aminés acides.

3. Action synthétisante des phosphatases

La synthèse des esters phosphoriques dans les cellules présente un intérêt capital étant donné son rôle dans les métabolismes. On a donc essayé de la reproduire *in vitro* pour l'étudier dans des conditions bien définies. Les enzymes utilisés dans ce but sont les phosphomonoestérases alcalines I du rein, de l'os et de l'intestin [56] [17] [38]. Ces phosphomonoestérases, agissant sur des solutions concentrées de phosphates et d'un alcool, catalysent la synthèse de l'ester jusqu'à un équilibre des constituants du milieu qui est identique à celui que l'on observe dans l'hydrolyse du même ester (Kay). La synthèse et le dédoublement des esters phosphoriques sont les deux aspects d'une réaction réversible. La biosynthèse des esters phosphoriques *in vitro* est une réaction lente (plusieurs jours à 37° C), s'opérant pour des concentrations très élevées en ions phosphates et en alcool, et au cours de laquelle le système enzymatique est susceptible de se modifier (inactiva-

tion partielle de la phosphatase, destruction d'activateurs naturels). Elle paraît à beaucoup d'égards différente des processus cellulaires de phosphorylation. Ceux-ci sont nécessairement liés d'une part à des inhibiteurs et activateurs naturels définis ou encore mal connus, et d'autre part à leur couplage avec des réactions d'oxydo-réduction. Il ne saurait en être autrement, étant donné l'extrême sensibilité du mécanisme réglant l'équilibre entre les phosphorylations et les déphosphorylations cellulaires au cours du métabolisme.

4. Role physiologique des systèmes phosphatasiques

L'hydrolyse et la synthèse des multiples combinaisons pyrophosphoriques et orthophosphoriques des cellules sont catalysées par des phosphatases. Comme ces réactions sont des étapes du métabolisme des glucides et des lipides, elles évoluent dans toutes les cellules, et les phosphatases y participent obligatoirement. Dans le cadre du métabolisme glucidique, il semble que certaines des réactions phosphorylantes et déphosphorylantes mettent en jeu des enzymes répondant aux types généraux que nous avons distingués, tandis que des enzymes spécifiques sont indispensables à d'autres. La teneur élevée des levures en phosphomonoestérases va de pair avec l'aptitude exceptionnelle de ces cellules à dégrader les oses. Le métabolisme des lipides est sous la dépendance de l'activité de certaines phosphatases, dans la mesure où il comporte la synthèse et la dégradation de lécithides et de corps voisins. La richesse en phosphomonoestérase II des graines oléagineuses du foie et de l'intestin mérite à cet égard d'être rappelée.

C. — PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Nous avons signalé à propos de l'étude des différents constituants phosphorés les dates des prélèvements et les conditions dans lesquelles ils ont été réalisés. Nous signalons ici que des dosages de l'activité phosphatasique ont été en outre déterminés durant l'année 1961 aux dates suivantes : 3, 6, 9 et 21 mai, 3, 12 et 21 juin, 22 septembre, 20 octobre, 14 novembre, 7 décembre et en 1964 : 20 et 25 février, 2, 4, 6, 9, 11, 13 mars.

1. Préparation de l'extrait phosphatasique

Après ouverture des moules à l'aide d'un scalpel, nous séparons les manteaux que nous essuyons entre des feuilles de papier filtre. Les manteaux sont pesés (100 g), broyés avec un broyeur mécanique type Ultra-Turrax, puis homogénéisés et portés à 500 ml avec de l'eau distillée et conservés dans la chambre froide sous toluène à $+4^{\circ}$ C. Nous obtenons ainsi une suspension à 20 p. 100 de tissu frais.

Avant chaque dosage, nous centrifugeons 20 ml de cette suspension

à 4 000 tours/minute pendant 20 minutes. L'activité phosphatasique est dosée dans le surnageant.

Nous étions amenée à étudier l'activité phosphatasique des extraits dialysés. Pour cela 50 ml de cette suspension sont dialysés sous toluène et dans la chambre froide à travers une membrane de cellophane (type spontex) contre de l'eau distillée, renouvelée toutes les 24 heures. Après dialyse, nous mesurons le volume de la suspension dialysée, nous le ramenons à 50 ml si c'est nécessaire. Nous prélevons 20 ml que nous centrifugeons à 4 000 tours/minute pendant 20 minutes et l'activité phosphatasique est dosée dans le surnageant.

2. Stabilité des suspensions conservées dans la chambre froide à $\pm 4^{\circ} \text{C}$ sous toluène

Nos suspensions étant conservées à la chambre froide, nous avons jugé nécessaire d'étudier leur stabilité au cours de la conservation à la chambre froide. Nous avons effectué des dosages à pH 4,2. Les résultats obtenus pour deux extraits A (23 mai) et B (21 juin) sont rapportés sur le tableau VI. Nous remarquons que l'activité phosphatasique est plus grande au bout d'une heure qu'immédiatement après broyage, puis qu'elle diminue avec le temps (d'environ 10 p. 100 au bout d'une semaine et de 50 p. 100 au bout de 15 jours). Nous pouvons expliquer l'augmentation d'activité observée au bout d'une heure par une libération des phosphatases ou d'activateurs de ces enzymes.

TABLEAU VI
VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE A pH 4,2 DE DEUX EXTRAITS DE MOULES AU COURS DE LA CONSERVATION

Extrait A			Extrait B		
Temps	Activité	X	Temps	Activité	X
0	10,95		0	12,00	
1 h	11,20		1 h	12,20	
1 j	11,00		1 j	12,10	
2 j	10,95		2 j	12,00	
3 j	10,80		3 j	11,90	
4 j	10,60		4 j	11,50	
5 j	10,50		5 j	11,35	
6 j	10,30		6 j	11,00	
7 j	9,95	10	7 j	10,70	10
8 j	9,80		8 j	10,50	
9 j	9,40		9 j	10,10	
10 j	9,00		10 j	9,20	
11 j	8,90		11 j	8,70	
12 j	8,00		12 j	8,10	
13 j	7,30		13 j	7,50	
14 j	6,60		14 j	6,80	
15 j	5,40	50	15 j	6,00	50
16 j	4,00		16 j	5,60	

Activité exprimée en unités phosphatasiques pour 1 g de tissu

X : pourcentage de la diminution de l'activité phosphatasique par rapport au premier dosage.

h : heure.

j : jour.

D. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1. Variation de l'activité phosphatasique en fonction du pH

En vue d'essayer de mettre en évidence les phosphomonoestérases contenues dans le manteau, nous avons mesuré l'activité des différents extraits pour des pH compris entre 3,4 et 9,0, une heure après broyage. Le tableau VII représente les résultats avec 3 extraits différents préparés les 3, 6 et 9 mai 1961. La figure 7 représente les variations de l'activité phosphatasique en fonction du pH pour le premier de ces trois extraits.

TABLEAU VII

VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE EN FONCTION DU pH

pH	1 ^{er} extrait	2 ^e extrait	3 ^e extrait
3,4	0,35	0,30	0,30
3,8	1,0	1,00	0,93
4,0	1,25	1,20	1,20
4,2	1,45	1,35	1,30
4,4	1,30	1,30	1,25
4,6	1,15	1,10	1,10
4,8	1,05	0,95	0,98
5,0	0,88	0,84	0,85
5,4	0,75	0,60	0,60
6,0	0,50	0,44	0,40
6,5	0,30	0,25	0,20
7,0	0,15	0,15	0,10
8,0	0,06	0,07	0,40
9,0	0,04	0,04	traces

Activités exprimées en mg de phénolphtaléine pour 1 g de tissu.

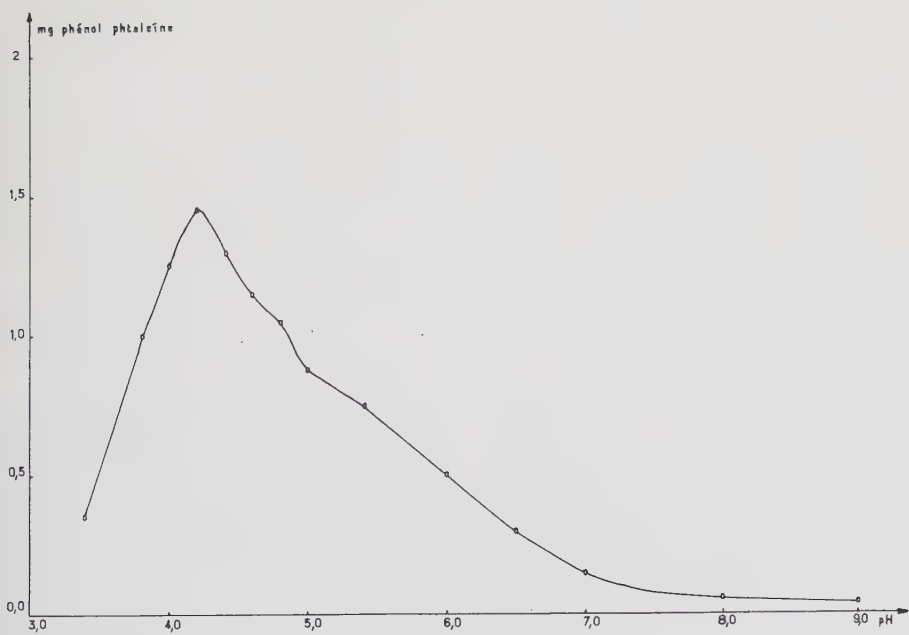


Fig. 7 Variations de l'activité phosphatasique en fonction du pH de l'extrait conservé à 4°C une heure après le broyage

Cette courbe montre que l'activité enzymatique, faible en milieu acide vers pH 3,4, passe par un maximum entre pH 4,0 et 4,4 et décroît lorsque le pH augmente pour s'annuler pratiquement à partir du pH 9.

Ces expériences mettent donc nettement en évidence l'existence d'un pH optimum d'action en milieu acide vers pH 4,2 et l'absence presque totale d'activité phosphatasique alcaline.

Nos résultats sont comparables à ceux de Roche [67] qui signale l'existence d'une activité phosphatasique acide de pH optimum 4,2-4,5 dans les muscles pédieux de *Mytilus edulis* et l'absence d'activité phosphatasique alcaline (figure 8).

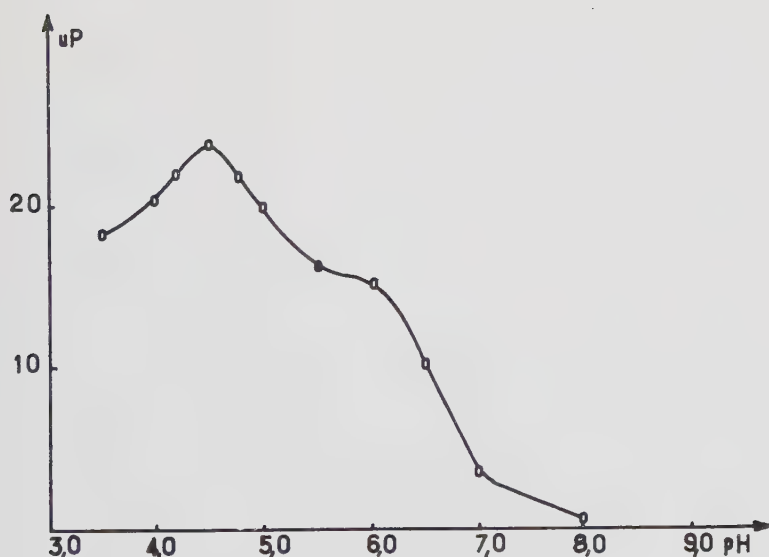


Fig. 8 Activité phosphomonoestérasiq à divers pH de l'extrait de muscle pédieux de MYTILUS EDULIS : extrait obtenu après une heure de macération à $4^{\circ}C$ (Roche [67])

2. Variation de l'activité phosphatasique en fonction du pH au cours du cycle annuel

Cette étude a été effectuée à partir des suspensions à 20 p. 100 de broyats dialysés et non dialysés. Dans le premier cas nous avons déterminé l'activité phosphatasique après 4 jours et 7 jours de dialyse des suspensions de broyat fraîchement préparées. L'activité phosphatasique des suspensions non dialysées est déterminée aussitôt après broyage, après une heure, 1 jour, 4 jours et 7 jours.

TABLEAU VIII
VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE AU COURS DU TEMPS
ET EN FONCTION DU pH

	Extrait non dialysé					Extrait dialysé	
pH	1	2	3	4	5	6	7
3,4	0,38	0,48	0,40	0,30	0,20	0,12	0,01
3,8	1,15	1,24	1,18	1,10	0,98	0,53	0,19
4,0	1,53	1,56	1,38	1,27	1,13	0,95	0,37
4,2	1,58	1,62	1,45	1,35	1,20	1,00	0,44
4,4	1,48	1,55	1,35	1,25	1,13	0,88	0,42
4,6	1,30	1,40	1,20	1,00	0,93	0,71	0,37
4,8	1,00	1,10	0,88	0,70	0,65	0,48	0,35
5,0	0,89	0,95	0,70	0,60	0,50	0,41	0,26
5,4	0,64	0,70	0,50	0,40	0,30	0,20	0,09
6,0	0,42	0,46	0,30	0,20	0,15	0,10	traces
6,5	0,28	0,30	0,15	0,10	0,05	traces	
7,0	0,17	0,20	0,10	0,04	traces		
8,0	0,065	0,08	0,04	traces			
9,0	0,04	0,04	traces				

Activité exprimée en mg de phénolphtaléine pour 1 g de tissu.

1. Activité phosphatasique de l'extrait directement après le broyage.
2. Activité phosphatasique de l'extrait 1 heure après le broyage.
3. Activité phosphatasique de l'extrait 1 jour après le broyage.
4. Activité phosphatasique de l'extrait 4 jours après le broyage.
5. Activité phosphatasique de l'extrait 7 jours après le broyage.
6. Activité phosphatasique de l'extrait dialysé 4 jours après le broyage.
7. Activité phosphatasique de l'extrait dialysé 7 jours après le broyage.

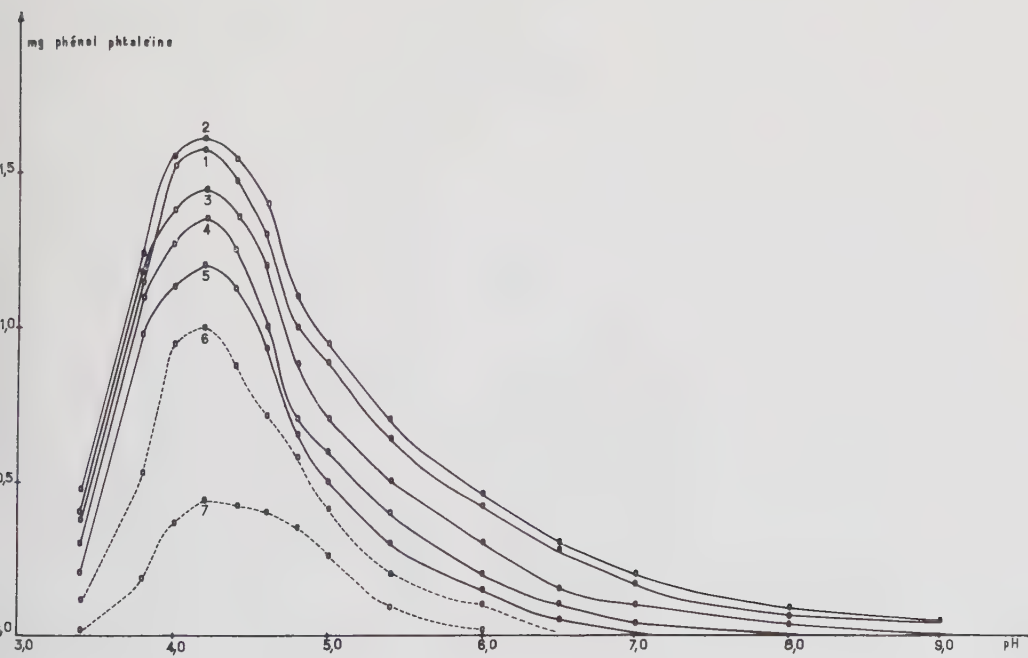


Fig. 9 Variations de l'activité phosphatasique au cours du temps et en fonction de pH

Pour chaque mois, nous avons déterminé l'activité phosphatasique aux pH compris entre 3,4 et 9,0. La figure 9 et le tableau VIII montrent les résultats obtenus pour le mois d'avril 1962. Ce tableau confirme l'existence d'un pH optimum d'action 4,2 et l'absence d'activité phosphatasique alcaline.

TABLEAU IX
VARIATION DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE AU COURS
DU CYCLE ANNUEL AU pH OPTIMUM D'ACTION 4,2

Date	Extrait non dialysé					Extrait dialysé		X
	1	2	3	4	5	6	7	
3-VI-61	12,10	12,40	12,10	11,80	11,00	8,90	6,00	9,0
12-VI-61	11,90	12,10	11,70	11,20	10,50	8,40	5,40	11
22-IX-61	9,20	9,30	9,00	8,60	8,20	5,40	3,60	10
20-X-61	10,00	10,30	9,60	9,20	9,00	6,90	4,00	10
14-XI-61	10,70	11,00	10,50	10,00	9,00	7,00	4,00	16
7-XII-61	11,00	11,40	11,10	10,70	10,20	6,00	4,00	7,2
15-I-62	11,30	11,60	11,00	10,80	10,10	6,30	4,20	10
15-II-62	11,60	11,90	11,70	10,90	10,00	8,30	7,10	13
15-III-62	12,10	12,70	11,80	11,20	10,50	8,90	8,00	13
17-IV-62	12,80	13,10	12,10	11,75	11,45	10,00	6,10	10
17-V-62	11,90	12,40	12,00	11,00	10,50	8,60	6,00	10
15-VI-62	11,50	11,85	11,50	11,30	10,65	8,85	5,15	7
12-VII-62	11,40	11,50	11,20	10,50	10,00	7,35	4,15	12
16-VIII-62	8,85	9,00	8,60	8,15	7,55	5,70	3,20	14
13-IX-62	8,75	8,85	8,30	7,10	6,40	4,55	3,00	26
13-X-62	9,55	10,25	9,90	9,20	9,00	8,70	7,50	5,7
13-XI-62	11,10	11,30	11,20	10,80	10,50	9,00	7,00	5,4
13-XII-62	11,40	11,80	11,40	10,80	10,00	7,75	6,10	12
28-I-63	9,20	9,60	9,20	9,00	8,40	7,00	5,20	8,7
16-II-63	10,00	10,30	10,00	9,30	9,00	7,20	6,00	10

Activité exprimée en unités phosphatasiques pour 1 g de tissu.

X : Pourcentage de la diminution d'activité phosphatasique au septième jour.

1 : Activité de l'extrait directement après le broyage.

2 : Activité de l'extrait 1 heure après le broyage.

3 : Activité de l'extrait 1 jour après le broyage.

4 : Activité de l'extrait 4 jours après le broyage.

5 : Activité de l'extrait 7 jours après le broyage.

6 : Activité de l'extrait dialysé 4 jours.

7 : Activité de l'extrait dialysé 7 jours.

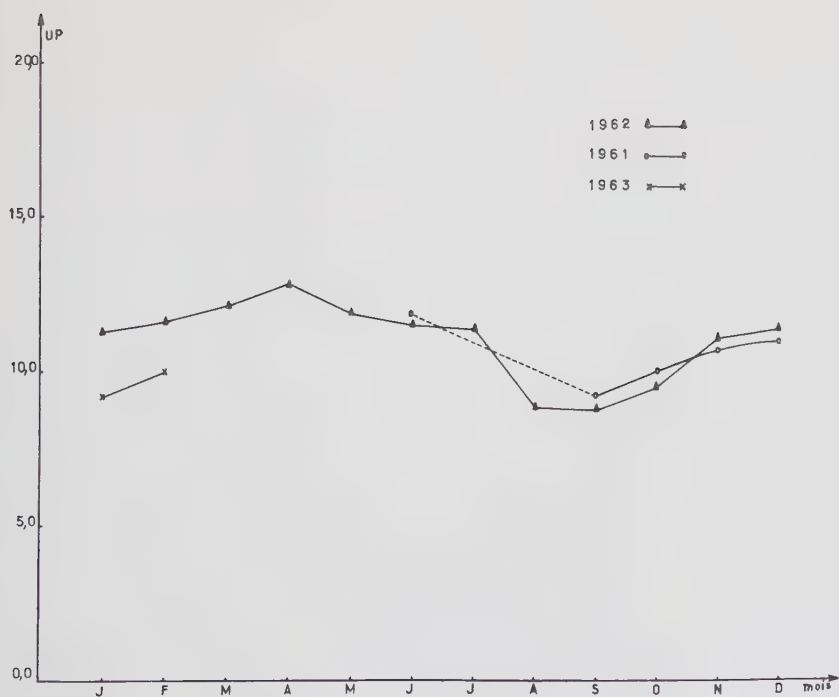


Fig. 10 Variations de l'activité phosphatasique de l'extrait obtenu directement après le broyage au pH 4,2 et au cours du cycle annuel

Le tableau IX et la figure 10 représentent les variations de l'activité phosphatasique au pH optimum d'action (pH 4,2), observées de juin 1961 à février 1963. Le tableau IX montre :

1° Que l'activité phosphatasique croît de janvier pour atteindre son maximum en avril (12,8 u); puis elle décroît pour atteindre son minimum en septembre (8,75 u).

2° Que des activités observées pendant des périodes correspondantes des années 1961 et 1962 sont sensiblement les mêmes.

3° Qu'en janvier et février 1963 l'activité phosphatasique est nettement plus faible qu'en 1962, ce que l'on peut attribuer à la vague de froid intense qui a sévi dans la région de Montpellier ($-17^{\circ}C$) durant cette période.

4° Que la variation de l'activité phosphatasique des extraits du manteau en fonction du temps, est plus grande lorsqu'on effectue les déterminations une heure après le broyage que lorsqu'on les effectue immédiatement après.

5° Que l'activité de l'extrait dialysé est toujours inférieure à celle de l'extrait non dialysé préparé à partir du même broyat. Ceci peut être dû à ce que la dialyse priverait la phosphatase de certains ions activateurs et, d'autre part, dénaturerait la phosphatase d'une manière irréversible.

6° Que le pourcentage de diminution de l'activité phosphatasique initiale de l'extrait non dialysé au septième jour est en général voisine de 10 p. 100. Nous notons cependant quelques exceptions (septembre 1962 : 26 p. 100, octobre et novembre 1962 : 5,7 et 5,4 p. 100) que nous ne pouvons pas interpréter.

3. Variation de l'activité phosphatasique au cours de la croissance

Dans les dosages d'activité phosphatasique pendant le cycle annuel nous avons opéré sur des moules âgées au moins de 2 ans et dans les conditions opératoires où ces dosages ont été faits nous n'avons mis en évidence qu'une activité phosphatasique acide de pH optimum d'action 4,2.

Étudiant l'activité phosphatasique alcaline du manteau de *Mytilus edulis*, Manigault [54] signale que cette activité est importante chez la Moule jeune, devient presque nulle chez la Moule adulte. Nous avons entrepris l'étude de l'activité phosphatasique en fonction de la croissance.

Nous avons opéré sur des moules âgées de 6 à 24 mois, l'étude de l'activité phosphatasique (une heure d'incubation à $37^{\circ}C$) en fonction du pH sur des moules âgées de 6 mois environ montre une activité phosphatasique alcaline à pH optimum d'action 8,8. Il est

TABLEAU X

VARIATION DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE AU COURS DE LA CROISSANCE

Age		6 mois		8 mois		12 mois		15 mois		18 mois		20 mois		24 mois	
Temps d'incubation		1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
Activités Phosphatasiques	pH 4,2	1,50		1,40		1,30		1,35		1,30		1,35		1,40	
	8,8	0,58	1,1	0,40	0,77	0,30	0,60	0,08	0,45	0,04	0,40	0,04	0,40	0,04	0,30

Activités phosphatasiques exprimées en mg de phénolptaléine pour 1 g de tissu

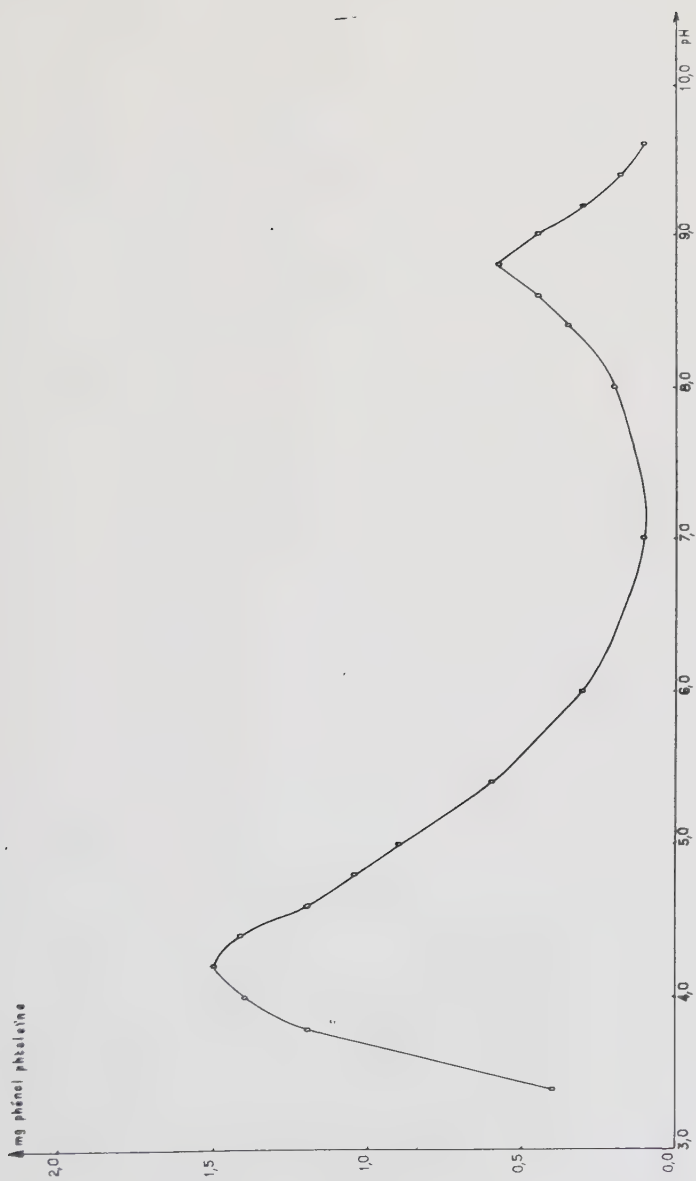


Fig. 11 Variation de l'activité phosphatasique en fonction du pH de l'extrait des moules âgées de 6 mois environ

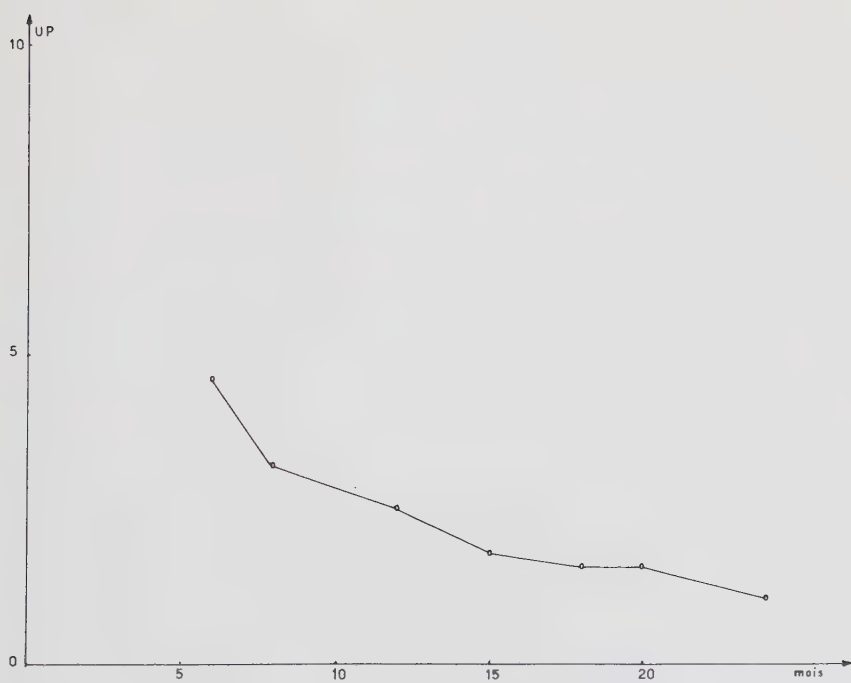


Fig. 12 Variations de l'activité phosphatasique alcaline en fonction de l'âge

à remarquer qu'elle est moins importante que l'activité phosphatasique acide (figure 11). Au cours de la croissance cette activité phosphatasique alcaline ne peut plus être mise en évidence à partir de 15 mois lorsqu'on incube pendant une heure à 37° C. Si l'on augmente la durée d'incubation à 24 heures on observe une activité phosphatasique alcaline faible chez les moules âgées de 2 ans. Ces résultats sont rapportés sur le tableau X.

Sur la figure 12 nous avons représenté les variations de l'activité phosphatasique alcaline en fonction de l'âge. Nous avons ramené arbitrairement à une heure l'activité phosphatasique déterminée après 24 heures d'incubation en divisant l'activité observée par 24 et nous avons admis que 1 mg de phénolphtaléine libérée par 1g de tissu en une heure à 37° C est égale à 1 000 unités phosphatasiques alcalines. Nous constatons que l'activité est très importante au début pour devenir très faible chez la Moule de 2 ans.

Nous avons étudié l'activité phosphatasique acide en fonction de l'âge pour voir si elle ne subit pas de variation pendant la croissance, ces résultats sont portés sur le tableau X. Nous constatons que l'activité phosphatasique acide de *pH* optimum 4,2 est aussi importante chez la jeune Moule que chez la Moule âgée. Donc chez *Mytilus galloprovincialis* Lmk jeune existe une phosphomonoestérase alcaline de *pH* optimum 8,8 et une phosphomonoestérase acide de *pH* optimum d'action 4,2. La première est très faible chez la Moule âgée de 2 ans, tandis que la phosphomonoestérase de *pH* optimum d'action 4,2 est aussi importante chez la Moule jeune que chez la Moule âgée.

4. Action des effecteurs

Nous avons préparé des solutions molaires de fluorure de sodium, sulfate de zinc, sulfate de magnésium, sulfate de manganèse, sulfate de cobalt, molybdate de sodium, et phosphate monopotassique.

A 5 ml d'extrait diastasique nous ajoutons 2 ml d'une solution d'effecteur de concentration M à 10^{-7} M et nous complétons à 10 ml. Le témoin est préparé par addition de 5 ml d'extrait à 5 ml d'eau distillée. L'activité diastasique est déterminée et les résultats sont portés sur le tableau XI.

Si nous considérons ce tableau nous constatons que l'activité phosphatasique est fortement inhibée par les ions fluorure et molybdate, elle est légèrement inhibée par les ions magnésium, zinc et phosphate, elle est insensible aux ions cobalt, elle est légèrement activée par les ions manganèse.

TABEAU XI
VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE
EN PRÉSENCE DE CERTAINS EFFECTEURS

Concentration	Fluorure de sodium	Molybdate de sodium	Sulfate de zinc	Sulfate de Magnésium	Phosphate monopotassique	Sulfate de cobalt	Sulfate de manganèse
0	11,75	11,75	11,75	11,72	11,75	11,75	11,20
2.10 ⁻⁶ M	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,20
2.10 ⁻⁵ M	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,20
2.10 ⁻⁴ M	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,75	11,20
2.10 ⁻³ M	9,50	10,50	11,75	11,75	11,75	11,75	11,40
2.10 ⁻² M	3,90	6,50	11,00	11,75	11,75	11,75	13,00
2.10 ⁻¹ M	0,0	traces	8,00	10,00	10,00		11,50

Activité exprimée en unités phosphatasiques pour 1 g de tissu.

5. Nature de la phosphomonoestérase contenue dans le manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk

Les caractères de la phosphatase acide qu'on a mis en évidence sont les suivants :

- pH optimum d'action : 4,2.
- Elle est fortement inhibée par les ions fluorure et molybdate.
- Elle est légèrement inhibée par les ions zinc, magnésium et phosphate.
- Elle est légèrement activée par les ions manganèse.

En nous rapportant à la classification des phosphatases (page 44) nous voyons que cette phosphatase se rapproche de celles du groupe III dont le pH optimum d'action est 3,9 à 4,2 et dont on sait qu'elles sont fortement inhibées par les ions fluorure et molybdate [19]. Cependant, il est établi depuis longtemps que la phosphatase du type III est labile, car elle disparaît en 24-48 heures au cours de l'autolyse des organes d'animaux [68] et lors de la conservation et la dialyse d'extraits d'organes [9] [66]. Elle est masquée par des inhibiteurs naturels dans les tissus. Or, la phosphomonoestérase acide de *Mytilus galloprovincialis* Lmk se comporte différemment : elle se révèle d'une stabilité assez élevée, comparativement aux enzymes de même pH déjà étudiés de ce groupe (la diminution de l'activité au bout d'une semaine était de 10 p. 100).

Nous la classons dans le groupe III mais avec certaines réserves, car elle est plus stable que les phosphatases du groupe III.

E. — INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE.

1. Variation des activités phosphatasiques au cours de la croissance

Nous avons dosé les activités phosphatasiques au cours de la croissance, nous avons remarqué que l'activité phosphatasique alcaline est importante chez la Moule jeune (6 mois) et diminue au fur et à mesure que la Moule croît pour devenir très faible chez la Moule âgée de 2 ans, ces résultats nous ont fait penser que la phosphatase alcaline joue un rôle important dans la croissance de la Moule, mais peut-être pas dans la formation de la coquille, car les auteurs qui ont étudié la constitution de la coquille [75], [20], [55] n'ont signalé que la présence de traces de phosphore. Ceci différencie la phosphatase alcaline de la Moule de celle des vertébrés, qui joue un rôle important dans l'ossification.

Nos connaissances actuelles sont insuffisantes pour pouvoir déterminer le rôle éventuel de la phosphatase alcaline dans la formation de la coquille. D'après les résultats que nous avons obtenus il semblerait qu'elle joue un rôle dans la croissance, plutôt que dans la formation de la coquille.

La phosphatase acide au cours de la croissance a montré une activité aussi importante chez la Moule jeune que chez la Moule âgée. Ceci nous incite à penser qu'elle joue un rôle dans les métabolismes cellulaires, c'est-à-dire qu'elle catalyse la synthèse et l'hydrolyse des combinaisons orthophosphoriques.

2. Relations avec le cycle annuel

Au cours du cycle biologique 1962, l'activité phosphatasique a montré des variations assez importantes. Nous avons en effet obtenu des valeurs extrêmes de 8,85 et 12,8 unités au pH optimum 4,2. Du 15 janvier au 17 avril, l'activité phosphatasique augmente au fur et à mesure que les produits sexuels sont libérés et atteint son maximum à la fin de la période de reproduction (avril et mai : 12,8 et 11,9 unités). Du 17 mai au 13 septembre l'activité phosphatasique diminue progressivement et atteint ses chiffres les plus bas aux mois d'août et de septembre (en août les manteaux sont les plus chargés en réserves et en septembre il y a formation des gamètes). Cette activité phosphatasique faible semble paradoxale pour un tissu en pleine activité. On pourrait expliquer ce fait ainsi : dans nos dosages nous avons toujours pris une quantité bien déterminée de manteaux (100 g). Nous avons dosé l'activité dans des dilutions à 20 p. 100 de broyat de manteau. Or, pendant les mois de mars, avril et mai nous avons remarqué qu'il faut au moins deux fois plus de moules que pendant les mois de juillet, août et septembre pour obtenir 100 g de broyat. Donc si nous rapportons nos résultats à la Moule en tant qu'individu, nous sommes obligés de multiplier les résultats de juillet, août et septembre au moins par deux et dans ce cas l'activité phosphatasique devient plus importante, ce qui semble normal pour un tissu en pleine activité.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons étudié les variations des divers constituants phosphorés et des activités phosphatasiques acide et alcaline du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk au cours d'un cycle biologique annuel.

L'étude des variations des constituants phosphorés a porté sur le phosphore acido-soluble (orthophosphate, phosphore organique, phosphate thermolabile), le phosphore lipidique, le phosphore nucléique (ARN et ADN), le phosphore résiduel (phosphoprotéines) et le phosphore total. La teneur de ces différentes formes de phosphore est maximum aux mois de juillet, août et septembre, c'est-à-dire pendant la période d'accumulation des réserves (juillet et août) puis pendant la gamétogénèse (septembre).

Les orthophosphates sont maximum en septembre, leur augmentation durant cette période est liée d'une part à l'accumulation des réserves, d'autre part à la gamétogénèse, leur diminution en octobre est liée à la libération des gamètes habituellement riches en orthophosphates.

Le phosphore lipidique ne subit pas de grandes variations, les valeurs maximales sont enregistrées en août, septembre et octobre.

Le phosphore résiduel présente les valeurs maximales en octobre après la libération massive des gamètes.

Le phosphore total est maximum pendant l'accumulation des réserves, la gamétogénèse et le frai, puis il diminue au fur et à mesure que les gamètes sont libérés et atteint ses chiffres les plus bas à la fin du cycle de reproduction (mars 1962).

L'étude des variations de l'activité phosphatasique du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk pendant le cycle biologique annuel a porté sur les activités phosphatasiques acide et alcaline chez les moules adultes.

Nous avons noté la présence d'une activité phosphatasique acide de pH optimum d'action 4,2 et l'absence totale d'activité phosphatasique alcaline.

L'étude des effecteurs de la phosphatase acide du manteau semble

indiquer que cet enzyme est du type III.

Au cours du cycle biologique l'activité phosphatasique acide déterminée à son *pH* optimum d'action est maximum pendant la période d'accumulation des réserves et la gamétogénèse lorsque les résultats sont rapportés à la Moule en temps qu'individu.

L'activité phosphatasique acide est pratiquement la même quel que soit l'âge de la Moule. Par contre il existe une activité phosphatasique alcaline de *pH* optimum 8,8 qui décroît rapidement de 6 mois à un an pour s'annuler pratiquement chez la Moule adulte (2 ans), ce qui semble indiquer son rôle dans la croissance et non dans la formation de la coquille.

En conclusion, le métabolisme des constituants phosphorés ainsi que l'activité phosphatasique acide du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk sont étroitement liés à la période d'accumulation des réserves et de la gamétogénèse.

Il est important de souligner la forte répercussion de la vague de froid (janvier et février 1963) sur le taux des différents constituants phosphorés et sur l'activité phosphatasique du manteau de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Albers (D.). — *Z. physiol. Chem.* **265**, 129, 1940.
- [2] Albers (H.), et Albers (E.). — *Z. physiol. Chem.* **232**, 165, 1935.
- [3] Albers (H.), et Albers (E.). — *Z. physiol. Chem.* **232**, 189, 1935.
- [4] Albers (H.), et Albers (E.). — *Z. physiol. Chem.* **235**, 47, 1935.
- [5] Asakawa (K.). — *J. Biochem.* **11**, 143, 1929.
- [6] Bamann (E.). — *Naturw.* **28**, 142, 1940.
- [7] Bamann (E.). — *Naturw.* **28**, 3405, 1940.
- [8] Bamann (E.), Reidel (R.) et Diederichs (K.). — *Z. physiol. Chem.* **230**, 175, 1934.
- [9] Bamann (E.) et Reidel (R.). — *Z. physiol. Chem.* **229**, 125, 1934.
- [10] Belfanti (S.), Contardi (A.) et Ercoli (A.). — *Biochem. J.* **29**, 842, 1935.
- [11] Bodansky (A.). — *J. biol. Chem.* **101**, 93, 1933.
- [12] Cloetens (R.). — *Biochem. Z.* **307**, 352, 1941.
- [13] Cloetens (R.). — *Biochem. Z.* **308**, 37, 1941.
- [14] Cloetens (R.). — *Biochem. Z.* **310**, 42, 1941.
- [15] Colowick (S.P.) et Kaplan (N.O.). — *Methods in enzymology*. Tome I, p. 141-145.
- [16] Courtois (J.). — Recherches sur les phosphatases végétales. *Thèse Doct. sc. phys.*, Paris, 1938.
- [17] Courtois (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.* **20**, 1393, 1938.
- [18] Courtois (J.) et Perles (R.). — *Précis de Chimie Biologique*, tome I, p. 172.
- [19] Courtois (J.) et Perls (R.). — *Précis de Chimie Biologique*, tome I, p. 174.
- [20] Creac'h (P.V.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*. **21**, 415, 1957.
- [21] Escot-Molinié. — Écologie de la Moule dans le bassin de Thau. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1955.
- [22] Escot-Molinié. — Écologie de la Moule dans le bassin de Thau. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1955, p. 49-51.
- [23] Florkin (M.), Lecrenier (P.) et Zangerle (R.). — *Bull. Soc. roy. sci. Liège*. **12**, 310, 1943. (*Chem. Abs.* **42**, 8352d, 1948.)
- [24] Genesi (M.). — *Riv. biol. (Perugia)*. **47**, 97, 1955. (*Chem. Abs.* **50**, 7335f, 1956.)
- [25] Gras (J.). — Étude biochimique du cycle évolutif de la Moule. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1958.
- [26] Gras (J.). — Étude biochimique du cycle évolutif de la Moule. *Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1958, p. 56.
- [27] Holmberg (C. G.). — *Biochem. Z.* **279**, 145, 1935.
- [28] Hommerberg (C.). — *Z. physiol. Chem.* **185**, 123, 1929.
- [29] Horiuchi (K.). — *J. Biochem.* **14**, 163, 1931.
- [30] Hotta (R.). — *J. Biochem.* **20**, 343, 1934.
- [31] Huggins (C.) et Talalay (P.). — *J. biol. Chem.* **159**, 399, 1945.
- [32] Itaru Usuki. — *Sci. Repts. Tohoku. Univ. Fourth. Ser.* **25**, 53, 1959. (*Chem. Abs.* **53**, 22531 i, 1959).
- [33] Iwatsuru (R.). — *Biochem. Z.* **173**, 348, 1926.
- [34] Jenner (H.D.) et Kay (H.D.). — *J. biol. Chem.* **93**, 733, 1931.
- [35] Kahane (E.). — *J. Pharm. et Chim.* **19**, 26, 1934.
- [36] Kamat (D.N.). — *J. Univ. Bombay (NS)* **24B**, 25, 1955. (*Chem. Abs.*, **51**, 10772a, 1957.)
- [37] Kay (H.D.). — *Physiol. Rev.* **12**, 384, 1932.
- [38] Kay (H.D.). — *Biochem. J.* **22**, 855, 1928.
- [39] Kishimoto (U.). — *Compt. Biochem. Physiol.* **2**, 81, 1961. (*Chem. Abs.* **55**, 9701g, 1961.)
- [40] Kuenzler (E.J.). — *Limnol. Oceanog.* **6**, 400, 1961.
- [41] Kutscher (W.) et Wüst (H.). — *Biochem. Z.* **310**, 292, 1941.
- [42] Lacaze-Duthier (de) H. — Mémoire sur l'organe de Bojanus. *Annal. Sciences nat.* Quatrième série. Tome IV, 1855.
- [43] Lambert (Ph.). — La Moule et la mytilculture. Imp. A. Guillot, Versailles.

- [44] Latreille (M.). — Contribution à l'étude des phosphatases. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1938, p. 50.
- [45] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* **23**, 443-444, 1959.
- [46] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* **23**, 430, 1959.
- [47] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* **23**, 417, 1959.
- [48] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*. **23**, 460 et 463, 1959.
- [49] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*. **23**, 446, 1959.
- [50] Lubet (P.). — *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*. **23**, 442, 1959.
- [51] Lundsteen (E.) et Vermehren (M.). — *Enzymolog.* **6**, 27, 1939.
- [52] Machebœuf (M.) et Delsal (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.* **25**, 116, 1943.
- [53] Manigault (P.). — *Ann. de l'Institut océanographique*. **18**, 346, 1939.
- [54] Manigault (P.). — *Ann. de l'Institut océanographique*. **18**, 359, 1939.
- [55] Manigault (P.). — *Ann. de l'Institut océanographique*. **18**, 377, 1939.
- [56] Martland (M.) et Robison (R.). — *Biochem. J.* **21**, 665, 1927.
- [57] Massart (L.) et Dufait (R.). — *Z. physiol. Chem.* **272**, 157, 1942.
- [58] Neuberg (C.) et Karczag (L.). — *Biochem. Z.* **36**, 60, 1911.
- [59] Neuberg (C.) et Wagner (J.) et Jacobsohn (K.P.). — *Biochem. Z.* **188**, 227, 1927.
- [60] Nguyen-van Thoai. — *Bull. Soc. Chim. biol.* **23**, 1183, 1941.
- [61] Nguyen-van Thoai. — *Bull. Soc. Chim. biol.* **24**, 1, 1942.
- [62] Pham-van Tat. — Differentiation sérologique de certains mollusques lamelli-branches. Étude de la spécificité antigénique des nucléoprotéines et acides nucléiques de *Mytilus edulis* et *Tapes decussatus* L. *Thèse Doct. Pharm.* Montpellier, 1961.
- [63] Povelyagina (Z.S.) et Telichenko M.M. - *Byull. Moskov. Obshchestva Ispytalei. Otdel., Biol.* **64**, 79, 1959. (*Chem. Abs.* **53**, 22443d, 1959.)
- [64] Robison (R.). — *Biochem. J.* **17**, 286, 1923.
- [65] Roche (J.) et Nguyen-van Thoai. — *Bull. Soc. Chim. biol.* **24**, 1237, 1942.
- [66] Roche (J.), Nguyen-van Thoai et Baudoin (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.* **24**, 1247, 1942.
- [67] Roche (J.), Bern (H.A.) et Nguyen-van Thoai. — *Bull. Soc. Chim.* **34**, 698, 1952.
- [68] Roche (J.) et Courtois (J.). — *Exposés annuels de biochim. méd.*, série 4, 250, 1944.
- [69] Roche (J.) et Courtois (J.). — *Exposés annuels de biochim. méd.*, série 4, 230, 1944.
- [70] Schäffner (A.) et Bauer (E.). — *Z. physiol. Chem.* **232**, 293, 1935.
- [71] Schneider (W.C.). — *J. biol. Chem.* **161**, 293, 1945.
- [72] Suzuki (U.), Yoshimura (K.) et Takaishi (M.). — *Tokyo Imp. Univ. Coll. Agric. Bull.* **7**, 503, 1907.
- [73] Uzawa (S.). — *J. Biochem.* **15**, 19, 1932.
- [74] Vinogradov (A.P.). — *The elementary chemical composition of marine organisms*, p. 270-374, 1953.
- [75] Vinogradov (A.P.). — *The elementary chemical composition of marine organisms*. 1953, p. 300.
- [76] Yoshio Ojima et Kyoso Ikenaga. — *Zool. Mag. Tokyo.* **63**, 26, 1954. (*Chem. Abs.* **50**, 15978d, 1956.)

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LOIS DU PARASITISME

VU et approuvé

Montpellier, le

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

B. CHARLES

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

Le Recteur de l'Académie de Montpellier,

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
--------------------	---

CHAPITRE PREMIER LA MOULE

A. — ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA MOULE	11
B. — PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT DES COQUILLAGES	12

CHAPITRE II

TECHNIQUES DE DOSAGE UTILISÉES

A. — TECHNIQUES DE DOSAGE DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS	13
B. — TECHNIQUE DE DOSAGE DES PHOSPHATASES ...	15
1. <i>Méthode de Bodansky</i>	15
2. <i>Méthode de Huggins et Talalay</i>	15
3. <i>Justification de la technique</i>	22

CHAPITRE III

ÉTUDE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS PHOSPHORÉS

A. — GÉNÉRALITÉS	23
B. — ÉTUDE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS PHOSPHORÉS	23
1. <i>Phosphore acido-soluble</i>	24
2. <i>Phosphore lipidique</i>	29
3. <i>Phosphore nucléaire</i>	29
4. <i>Phosphore résiduel</i>	35
5. <i>Phosphore total</i>	35
C. — DISCUSSION	37

D. — INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE	39
1. <i>Phosphore acido-soluble</i>	39
2. <i>Phosphore lipidique</i>	40
3. <i>Phosphore nucléique</i>	40
4. <i>Phosphore résiduel</i>	41

CHAPITRE IV

ÉTUDE DES PHOSPHATASES

A. — GÉNÉRALITÉS	43
B. — APERÇU GÉNÉRAL SUR LES PHOSPHOMONO- ESTÉRASES	43
1. <i>Répartition</i>	43
2. <i>Effecteurs</i>	45
3. <i>Action synthétisante des phosphatases</i>	47
4. <i>Rôle physiologique du système phosphatasique</i>	48
C. — PARTIE EXPÉRIMENTALE	48
1. <i>Préparation de l'extrait phosphatasique</i>	48
2. <i>Stabilité des suspensions conservées à la chambre froide à + 4° C sous toluène</i>	49
D. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	50
1. <i>Variation de l'activité phosphatasique en fonction du pH</i>	50
2. <i>Variation de l'activité phosphatasique en fonction du pH au cours du cycle annuel</i>	54
3. <i>Variation de l'activité phosphatasique au cours de la croissance</i>	61
4. <i>Action des effecteurs</i>	67
5. <i>Nature de la phosphatase acide contenue dans le manteau de <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk</i>	68
E. — INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE	69
1. <i>Variation de l'activité phosphatasique au cours de la croissance</i>	69
2. <i>Relation avec le cycle biologique</i>	69

CHAPITRE V

CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE	73

Imp. Occitane - Montpellier